



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EFFECTO DE LAS CITOQUININAS EN LA  
MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE CUATRO  
VARIEDADES DE ARÁNDANO (*Vaccinium  
corymbosum*), A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES,  
CHACHAPOYAS AMAZONAS**

**AUTOR : Bach. Jessy Patricia Arista Bustamante**

**ASESOR : Ing. Msc. Santos Triunfo Leiva Espinoza**

**CO-ASESOR : Dr. Juan Carlos Guerrero Abad**

**Ing. Roicer Collazos Silva**

**Registro:**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2019**



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRIGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGRARIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRÓNOMA**

**TESIS**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**

**EFFECTO DE LAS CITOQUININAS EN LA  
MULTIPLICACIÓN IN VITRO DE CUATRO  
VARIEDADES DE ARÁNDANO (*Vaccinium  
corymbosum*), A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES,  
CHACHAPOYAS AMAZONAS**

**AUTOR : Bach. Jessy Patricia Arista Bustamante**

**ASESOR : Ing. Msc. Santos Triunfo Leiva Espinoza**

**CO-ASESOR : Dr. Juan Carlos Guerrero Abad**

**Ing. Roicer Collazos Silva**

**Registro:**

**CHACHAPOYAS – PERU**

**2019**

## **DEDICATORIA**

Al creador de todas las cosas por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorar cada día más; por ello, con toda la humildad que de mi corazón pueda emanar, dedico primeramente este trabajo a Dios.

A mis dos ángeles en el cielo, Jeremic y Santiaguito.

A mis abuelitos Modesto Bustamante Tapia y Clara Cuchca López por ser todo en mi vida, esta tesis es el resultado de lo que me han enseñado en la vida por el amor incondicional que me brindaron desde niña, por estar en cada uno de mis buenos y malos momentos, por las enseñanzas, y los mensajes de aliento y por la excelente manera de instruirme para afrontar las verdades de esta vida.

A mi madre Juana Bustamante Cuchca por ser la mujer más luchadora que he conocido y a pesar de los obstáculos sigues ahí de pie para ser mi amiga y compañera. Gracias por llevarme en tus oraciones porque estoy segura que siempre lo haces.

A mi padre Luis G. Arista Chávez por ser el ejemplo para salir adelante, por ser una persona honesta entregada a su trabajo pero más que todo por ser una gran persona que siempre ha podido salir adelante y ser triunfador, gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de culminar esta etapa de mi vida.

A Ricardo Encina Ruiz por ser mi compañero, mi confidente y apoyarme siempre, pero sobre todo, por estar en este momento tan importante de mi vida.

A mis hermanos Luis y Enrique por el apoyo moral y emocional, por compartir sus vidas conmigo y convertirse en un motivo más para salir adelante.

*Jessy P.*

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas y en particular a la Escuela Profesional de Ingeniería Agrónoma por los conocimientos teóricos recibidos durante mi formación profesional.

A todos los profesores de la UNTRM, en especial a los docentes de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias Ing. Por las enseñanzas y todo el apoyo durante mi formación profesional.

Al Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva INDES-CES, por haberme brindado la oportunidad y apoyarme en el desarrollo de mi tesis.

Al proyecto “Comportamiento productivo de variedades de arándano provenientes de la propagación in vitro por pisos altitudinales - provincia de Chachapoyas”, financiado por el Programa Nacional de Innovación Agraria- PNIA

A mi asesor el Ing. Santos Triunfo Leiva Espinoza a mi co-asesor el Dr. Juan Carlos Guerrero Abad y al Ing. Roicer Collazos Silva por su apoyo durante la ejecución del proyecto.

Al Coordinador del proyecto el M. Sc. Segundo Manuel Oliva Cruz, Co-investigador del proyecto Nuri Carito Vilca Valqui y Coordinador administrativo Elizabeth silva Díaz por el apoyo durante la ejecución de la tesis.

A mis mejores amigos Gim Keith, Nuri Carito y Rosa Purihuamán por los consejos, los ánimos y por el apoyo incondicional en cada momento.

Por último agradecer a todas las personas que de alguna u otra manera se han involucrado en mi vida para brindarme su apoyo en diferentes aspectos.

*Jessy P.*

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Dr. POLICARIO CHAUCA VALQUI

**Rector**

Dr. MIGUEL ÁNGEL BARRENA GURBILLÓN

**Vicerrector Académico**

Dra. FLOR TERESA GARCÍA HUAMÁN

**Vicerrectora de Investigación**

M.Sc. ERICK ALDO AUQUIÑIVÍN SILVA

**Decano de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias**

### **VISTO BUENO DEL ASESOR**

El Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza, investigador del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), deja constancia que ha asesorado el proyecto de investigación y la realización de la tesis titulada: “Efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*), a partir de segmentos nodales, Chachapoyas-Amazonas”, de la Bach. Jessy Patricia Arista Bustamante, para que sea sometida a la revisión del Jurado Evaluador, comprometiéndome a orientar en el levantamiento de observaciones para su posterior sustentación.

POR LO TANTO:

Firmo la presente para mayor constancia

Chachapoyas, junio de 2019



**Mg. Santos Triunfo Leiva Espinoza**

Investigador-INDES-CES

---

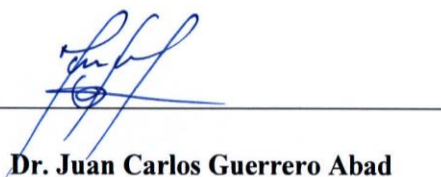
### **VISTO BUENO DEL CO ASESOR**

El Dr. Juan Carlos Guerrero Abad, investigador del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), deja constancia que ha asesorado el proyecto de investigación de la tesis titulada: “Efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*), a partir de segmentos nodales, Chachapoyas-Amazonas” de la Bach. Jessy Patricia Arista Bustamante, para que sea sometida a la revisión del Jurado Evaluador, comprometiéndome a orientar en el levantamiento de observaciones para su posterior sustentación

POR LO TANTO:

Firmo la presente para mayor constancia

Chachapoyas, junio de 2019



**Dr. Juan Carlos Guerrero Abad**

Investigador-INDES-CES

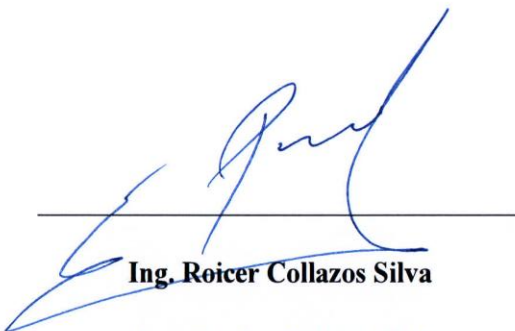
### **VISTO BUENO DEL CO ASESOR**

El Ing. Roicer Collazos Silva, investigador del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), deja constancia que asesorado el proyecto de investigación de la tesis titulada: “Efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*), a partir de segmentos nodales, Chachapoyas-Amazonas” de la Bach. Jessy Patricia Arista Bustamante, para que sea sometida a la revisión del Jurado Evaluador, comprometiéndome a orientar en el levantamiento de observaciones para su posterior sustentación

POR LO TANTO:

Firmo la presente para mayor constancia

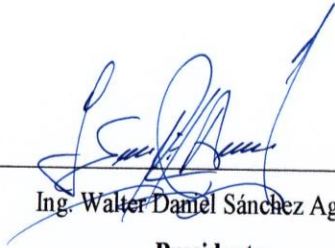
Chachapoyas, junio de 2019



**Ing. Roicer Collazos Silva**  
Investigador-INDES-CES



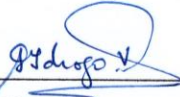
**JURADO EVALUADOR DE TESIS**



---

Ing. Walter Daniel Sánchez Aguilar


**Presidente**



---

Ing. Guillermo Idrogo Vásquez

**Secretario**



---

Ing. Ms. Jheiner Vásquez García

**Vocal**

## DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO

Yo, **Jessy Patricia Arista Bustamante**, identificado con **DNI 76771639** estudiante de la Escuela Profesional de **Ingeniería Agrónoma** de la Facultad de **Ingeniería y Ciencias Agrarias** de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor de la tesis titulada:

**“Efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*), a partir de segmentos nodales, Chachapoyas-Amazonas”**

La misma que presento para optar:

**El título profesional de Ingeniero Agrónomo**

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo toda responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada. Así mismo, por la presente me comprometo a asumir además todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse para la UNTRM en favor de terceros por motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontraren causa en el contenido de la tesis.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones civiles y penales que de mi acción deriven.

Chachapoyas, junio de 2019

# ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE  
MENDOZA DE AMAZONAS

Secretaría General  
OFICINA DE GRADOS Y TÍTULOS

## ANEXO 3-N

### ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL

En la ciudad de Chachapoyas, el día 04 de DICIEMBRE del año 2018, siendo las 18:30 horas, el aspirante JESSY PATRICIA ARISTA GUSTAMANTE defiende en sesión pública la Tesis titulada: EFFECTO DE LAS CITOQUININAS EN LA MULTIPLICACIÓN IN-VITRO DE CUATRO VARIEDADES DE ARÁNDANO (VACCINIUM CORYMBOSUM), A PARTIR DE SEGMENTOS NODALES, CHACHAPOYAS - AMAZONAS

para obtener el Título Profesional de INGENIERO AGRÓNOMO a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ante el Jurado Evaluador, constituido por:

Presidente : ING. Mg.Sc. WALTER DANIEL SANCHEZ AGUILAR

Secretario : ING. GUILLERMO EDUARDO VÁSQUEZ

Vocal : ING. Ms. SHEINER VÁSQUEZ GARCÍA

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto, a fin de que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida la Tesis para obtener el Título Profesional, en términos de:

Aprobado (  )      Desaprobado (  )

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 19:41 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Título Profesional.

Jessy Arista Gustamante  
SECRETARIO

OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_



## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS.....	v
VISTO BUENO DEL ASESOR.....	vi
VISTO BUENO DEL CO ASESOR.....	vii
VISTO BUENO DEL CO ASESOR.....	viii
JURADO EVALUADOR DE TESIS.....	ix
DECLARACIÓN JURADA DE NO PLAGIO.....	x
ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN DE LA TESIS.....	xi
ÍNDICE GENERAL.....	xii
ÍNDICE DE TABLAS.....	xiv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvii
ABSTRACT.....	xviii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. MARCO TEÓRICO.....	4
3.1. Antecedentes de la investigación.....	4
3.2. Base teórica.....	6
3.2.1. Origen, historia y distribución del Arándano.....	6
3.2.2. Clasificación botánica.....	6
3.2.3. Morfología.....	7
3.2.4. Especies.....	8
3.2.5. Variedades de arándano.....	9
3.2.6. Propagación del arándano.....	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
4.1. Ubicación del área de estudio.....	16
4.2. Diseño de contrastación de la hipótesis.....	16
4.3. Diseño de tratamientos.....	16
4.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	19

4.4.1. Fase de campo.....	19
4.4.2. Fase de laboratorio.....	20
4.4.3. Evaluaciones.....	24
4.5.Análisis de datos.....	26
V. RESULTADOS.....	27
5.1.Determinación de la concentración de Zeatina con un mejor comportamiento durante la multiplicación <i>in vitro</i> .....	27
5.1.1. Número de brotes.....	27
5.1.2. Número de hojas.....	27
5.1.3. Altura (cm).....	28
5.1.4. Número de ramificaciones.....	29
5.2.Determinación de la concentración de Trans-zeatina con un mejor comportamiento durante la multiplicación <i>in vitro</i> .....	30
5.2.1. Número de brotes.....	30
5.2.2. Número de hojas.....	30
5.2.3. Altura (cm).....	31
5.2.4. Número de ramificaciones.....	32
5.3.Determinación de la concentración de Cis-zeatina con un mejor comportamiento durante la multiplicación <i>in vitro</i> .....	33
5.3.1. Número de brotes.....	33
5.3.2. Número de hojas.....	33
5.3.3. Altura (cm).....	34
5.3.4. Número de ramificaciones.....	35
5.4.Relación de similitud de los tratamientos durante la multiplicación in vitro.....	36
VI. DISCUSIONES.....	38
VII. CONCLUSIONES.....	41
VIII. RECOMENDACIONES.....	42
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
X. ANEXOS.....	49
10.1. ANEXOS 1: Tablas.....	49
10.2. ANEXOS 2: Panel fotográfico.....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Diseño de los tratamientos 4Ax3Bx4C .....	17
<b>Tabla 2.</b> Distribución de los tratamientos en un diseño completamente al azar....	18
<b>Tabla 3.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para las variables número de brotes, hojas, ramificaciones y altura bajo cuatro concentraciones de Zeatina.....	49
<b>Tabla 4.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para las variables número de brotes, hojas, altura, ramificaciones y altura bajo cuatro concentraciones de Trans-zeatina.....	49
<b>Tabla 5.</b> Prueba de Kruskal-Wallis para las variables número de brotes, hojas, ramificaciones y altura bajo cuatro concentraciones de Cis-zeatina.....	49
<b>Tabla 6.</b> Comparación de medias para el variable número de brotes en función a cuatro concentraciones de Zeatina.....	50
<b>Tabla 7.</b> Comparación de medias para el variable número de hojas en función a cuatro concentraciones de Zeatina.....	50
<b>Tabla 8.</b> Comparación de medias para la variable altura de planta en función a cuatro concentraciones de Zeatina.....	51
<b>Tabla 9.</b> Comparación de medias para el variable número de brotes en función a cuatro concentraciones de Zeatina.....	51
<b>Tabla 10.</b> Comparación de medias para el variable número de hojas en función a cuatro concentraciones de Trans-zeatina.....	52
<b>Tabla 11.</b> Comparación de medias para la variable altura de planta en función a cuatro concentraciones de Trans-zeatina.....	52
<b>Tabla 12.</b> Comparación de medias para el variable número de ramificaciones en función a cuatro concentraciones de Trans-zeatina.....	53
<b>Tabla 13.</b> Comparación de medias para el variable número de brotes en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina.....	53
<b>Tabla 14.</b> Comparación de medias para el variable número de hojas s en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina.....	54
<b>Tabla 15.</b> Comparación de medias para el variable altura de planta en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina.....	54
<b>Tabla 16.</b> Diseño trifactorial de los tratamientos en un diseño completamente al Azar.....	55

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ubicación geográfica del área de estudio.....	16
<b>Figura 2.</b> Imagen satelital, ubicación de la estación experimental.....	19
<b>Figura 3.</b> Fase de campo.....	20
<b>Figura 4.</b> Preparación del medio de cultivo.....	21
<b>Figura 5.</b> Desinfección del material vegetal seleccionado.....	22
<b>Figura 6.</b> Introducción de los segmentos nodales.....	23
<b>Figura 7.</b> Multiplicación in vitro.....	24
<b>Figura 8.</b> Evaluación de altura de la plántula en (cm).....	26
<b>Figura 9.</b> Número de brotes en función a cuatro concentraciones de Zeatina.....	27
<b>Figura 10.</b> Número de hojas en función a cuatro concentraciones de Zeatina.....	28
<b>Figura 11.</b> Altura (cm) de planta en función a cuatro concentraciones de Zeatina..	29
<b>Figura 12.</b> Número de ramificaciones en función a cuatro concentraciones de zeatina.....	29
<b>Figura 13.</b> Número de brotes en función a cuatro concentraciones de Trans- Zeatina.....	30
<b>Figura 14.</b> Número de hojas en función a cuatro concentraciones de Trans- zeatina.....	31
<b>Figura 15.</b> Altura (cm) en función a cuatro concentraciones de Trans-zeatina....	31
<b>Figura 16.</b> Número de ramificación en función a cuatro concentraciones de Trans-zeatina.....	32
<b>Figura 17.</b> Número de brotes en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina.	33
<b>Figura 18.</b> Número de Hojas en función a cuatro concentraciones de Cis- zeatina.....	34
<b>Figura 19.</b> Altura (cm) en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina.....	35
<b>Figura 20.</b> Número de ramificaciones en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina.....	35
<b>Figura 21.</b> Relación de similitud con relación a variedades, tipo de citoquininas y concentración de citoquinina.....	37
<b>Figura 22.</b> Diseño de la observación visual de cada tratamiento.....	56
<b>Figura 23.</b> Fase de establecimiento en medio de cultivo líquido.....	56
<b>Figura 24.</b> Tratamiento 3 (Biloxi a 2.0mg/L de Zeatina) .....	57
<b>Figura 25.</b> Tratamiento 27 (Bluecrop a 2.0mg/L de Zeatina) .....	57

<b>Figura 26.</b> Tratamiento 2 (Biloxi a 1.0mg/L de Zeatina) .....	58
<b>Figura 27.</b> Tratamiento 28 (Bluecrop a 4.0mg/L de Zeatina) .....	58
<b>Figura 28.</b> Tratamiento 14 (Legacy a 1.0mg/L de Zeatina) .....	59
<b>Figura 29.</b> Tratamiento 4 (Biloxi a 4.0mg/L de Zeatina) .....	59
<b>Figura 30.</b> Tratamiento 19 (Legacy a 2.0mg/L de Trans-zeatina) .....	60
<b>Figura 31.</b> Tratamiento 43 (Star a 2.0mg/L de Trans-zeatina) .....	60
<b>Figura 32.</b> Tratamiento 6 (Biloxi a 1.0mg/L de Trans-zeatina) .....	61
<b>Figura 33.</b> Tratamiento 11 (Biloxi a 2.0mg/L de Cis-zeatina) .....	61
<b>Figura 34.</b> Tratamiento 9 (Biloxi a 0.0mg/L de Cis-zeatina) .....	62
<b>Figura 35.</b> Tratamiento 46 (Star a 1.0mg/L de Cis-zeatina) .....	62



## RESUMEN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Fisiología y Biotecnología vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, con el objetivo principal de evaluar el efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*) a partir de segmentos nodales. Para lo cual se trabajó con cuatro variedades (Biloxi, Legacy, Star y Bluecrop), bajo la aplicación de tres citoquininas del tipo Isoprenoides (Zeatina, Trans-zeatina y Cis-zeatina), a diferentes concentraciones (0.0mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L y 4.0mg/L), respectivamente. El diseño del experimento fue un DCA (Trifactorial), con 48 (cuarenta y ocho) tratamientos y 10 (diez) repeticiones. Las variables en estudio fueron; número de brotes, número de hojas, altura y número de ramificaciones, las evaluaciones se realizaron cada 10 días durante dos meses. Para el análisis de los datos se trabajó con la prueba estadística no paramétrica de Kruskal-Wallis, donde los resultados indicaron que hubo diferencia significativa en las variables de estudio, con lo que se determinó que Zeatina a una concentración de 2mg/L presentó el mayor comportamiento en cuanto a número de brotes y altura en las variedades Biloxi y Bluecrop, así mismo Trans-zeatina a 2.0mg/L mostró mayor número de hojas en la variedad Legacy y número de ramificaciones en las variedades Biloxi, Legacy y Star, por otro lado se evidenció que cis-zeatina fue la citoquinina que presentó un comportamiento inactivo en las cuatro variedades de arándano.

**Palabras claves:** Organogénesis directa, Zeatina, Trans-zeatina, Cis-zeatina, brotación

## ABSTRACT

The present investigation was carried out in the laboratory of Plant Physiology and Biotechnology of the Toribio Rodríguez de Mendoza National University of Amazonas, with the main objective of evaluating the effect of cytokinins in the *in vitro* multiplication of four varieties of cranberry (*Vaccinium corymbosum*) from nodal segments. For which we worked with four varieties (Biloxi, Legacy, Star and Bluecrop), under the application of three cytokinins of Isoprenoid type (Zeatin, Trans-zeatin and Cis-zeatin), at different (0.0mg / L, 1.0mg / L, 2.0mg / L and 4.0mg / L), respectively. The design of the experiment was a DCA (Trifactorial), with 48 (forty eight) treatments and 10 (ten) repetitions. The variables under study were; number of shoots, number of leaves, height and number of branches, evaluations were made every 10 days for two months.

For the analysis of the data we worked with the Kruskal-Wallis non-parametric statistical test, where the results indicated that there was a significant difference in the study variables, with which it was determined that Zeatina at a concentration of 2mg / L had the highest behavior in number of shoots and height in the Biloxi and Bluecrop varieties, likewise Trans-zeatina at 2.0mg / L showed greater number of leaves in the Legacy variety and number of branches in the Biloxi, Legacy and Star varieties, on the other On the other hand it was evidenced that cis-zeatin was the cytokinin that presented an inactive behavior in the four varieties of cranberry.

**Keywords:** Direct organogenesis, Zeatin, Trans-zeatin, Cis-zeatin, sproutin.

## I. INTRODUCCIÓN

El arándano es un fruto perteneciente a la familia de las Ericáceas, y al género *Vaccinium* originario de Norte América, siendo Estados Unidos el principal productor e importador a nivel mundial. Entre las especies cultivadas del género *Vaccinium*, las de mayor importancia son el arándano ojo de conejo (*Vaccinium ashei* R) y el arándano alto o “highbush” (*Vaccinium corymbosum* L.) con más del 80% del total de las especies cultivadas (Trehane, 2004).

Su consumo contribuye a una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, inhibe el crecimiento de células cancerosas, previniendo enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad del Alzheimer (Singh et al., 2008), también destaca su contenido en vitamina C, fibra y minerales, no obstante el mayor beneficio de esta fruta proviene de su concentración en antocianinas, sustancias con gran capacidad antioxidante y un enorme potencial anticancerígeno.

En cuanto a los principales países productores de arándano, destacan Estados Unidos y Canadá, que participan con el 56,9% y el 25,9% respectivamente del total producido en el año 2013, ambos países en conjunto han sumado un total de 348 mil toneladas de producción y han desarrollado sus cultivos en 31,6 mil has en el caso de Estados Unidos y 37,6 mil has en el caso de Canadá, en cuanto al Perú, las cifras de productividad al 2013 muestran un promedio de 1,8; estimando que para el 2015 llegarían a 3,1 toneladas y en el 2016 a 4,8 toneladas por hectárea (MINAGRI, 2016).

Velásquez y Daga (2016), mencionaron que en el departamento de Amazonas existen entre 5,000 y 7,000 hectáreas para desarrollar la siembra de los llamados “Frutos del bosque”, gracias a sus condiciones agroclimáticas de frío y diferentes pisos altitudinales, Amazonas es por excelencia una región de gran potencial para la siembra de los berries, ¿pero que los frena?, la barrera principal es la disponibilidad de plántones con buenas características genéticas.

Debido al gran aumento en la superficie cultivada de arándanos desde sus inicios hasta la fecha, se ha generado un gran incremento en la demanda de plantas de buena calidad, traducido en un mejoramiento del sistema de propagación tradicional y el uso de nuevas técnicas de producción de plantas, como es el uso de herramientas biotecnológicas, con el propósito de producir, mejorar y adaptar cultivares a diferentes condiciones climáticas y edafológicas (Pérez, 1998).

La micropropagación, es una técnica especial dentro de la biotecnología vegetal, caracterizada por manejar condiciones de esterilidad, que posee diversas ventajas tales como, menor tiempo de propagación, exclusión de patógenos y potencial para conservación a largo plazo, respecto a los métodos convencionales (Trauco, 2016).

Se ha demostrado que las plantas de arándano derivadas de cultivo de tejidos tienen un ámbito de crecimiento con mayor brotación y yemas florales, lo que significa mayor cantidad de frutos, otra ventaja que presenta es la calidad sanitaria, así como su utilización en variedades que son difíciles de enraizar, por otro lado el cultivo *in vitro* puede optimizar la obtención de clones de arándano resistente a factores bióticos y abióticos, y de elevada producción en grandes cantidades y en tiempos menores (Rodríguez *et al.*, 20015).

Por otro lado los reguladores de crecimiento como las Citoquininas, las Auxinas y las Giberelinas cumplen un rol clave en la producción de plántulas *in vitro* de diferentes especies, sin los reguladores de crecimiento específicos, no sería posible lograr el incremento de la tasa de multiplicación (Jordan & Casaretto, 2006).

Las citoquininas son las encargadas de interrumpir la dominancia apical y así promover la inducción y proliferación de las yemas axilares *in vitro*, siendo importante determinar las concentraciones más adecuadas y el tipo de citoquinina que debe usarse en cada caso, estos son los factores de mayor influencia en el éxito de la micropropagación *in vitro*, específicamente para el cultivo *in vitro* del género *Vaccinium*, se estableció que las citocininas tenían un importante efecto en la proliferación de brotes (Erig & Schuch, 2006).

Por lo que con esta investigación consideramos necesario determinar la concentración de citoquinina con un mejor comportamiento en la etapa de multiplicación *in vitro* de cuatro variedades de arándano, de esta manera los resultados de la investigación se convertirá en una herramienta esencial en la multiplicación *in vitro* de arándano y así a través de esta metodología generar una micropropagación masiva incrementando la población de plántulas con progenies homogéneas en un periodo de tiempo más corto, y así contribuir en el desarrollo de los pequeños productores de la provincia de Chachapoyas.

## II. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de las citoquininas en la multiplicación *in vitro* de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*) a partir de segmentos nodales.

### 2.2. Objetivos específicos

- Determinar la concentración de Zeatina que tenga un mejor comportamiento durante la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de cuatro variedades de Arándano (*Vaccinium corymbosum*).
- Determinar la concentración de trans-zeatina que tenga un mejor comportamiento durante la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de cuatro variedades de Arándano (*Vaccinium corymbosum*).
- Determinar la concentración de cis-zeatina que tenga un mejor comportamiento durante la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de cuatro variedades de Arándano (*Vaccinium corymbosum*).
- Establecer relación de similitud entre los tratamientos durante la multiplicación *in vitro*.

### III. MARCO TEÓRICO

#### 3.1. Antecedentes de la investigación

Torres, Trujillo y Arahana (2010), en la investigación “Cultivo *In vitro* de mortiño (*Vaccinium floribundum*)”, tuvieron como objetivo establecer métodos de propagación *in vitro* en mortiño en la germinación de semillas y brotación de yemas axilares. Para la germinación de las semillas utilizaron un medio basal sin hormonas en el que las semillas germinaron hasta un 60.7%, para la multiplicación *in vitro*, utilizaron el medio basal Woody Plant Medium (WPM) suplementado con trans-zeatina, BAP, 2iP y NAA, para promover la proliferación y elongación de los brotes; los resultados que obtuvieron en esta investigación demostraron que el medio WPM suplementado con trans-zeatina ( $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ) y NAA ( $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$ ), fueron los más adecuados para la multiplicación de plántulas de mortiño, con lo que obtuvieron un mayor número de brotes y abundantes ramificaciones.

Según Ostrolucká1 *et al.* (2014), en la investigación “Propagación *in vitro* de las especies de *Vaccinium*”, donde trabajaron con brotes de cultivares de *Vaccinium vitis* (Red Pearl y Koralle) y *Vaccinium corymbosum* (Blueray, Darrow, Berkeley, Bluecrop y Duke), los explantes fueron cultivados mediante organogénesis directa en un medio de cultivo Anderson suplementado con zeatina y (2iP), en concentraciones de 0,5; 1,0; 2,0  $\text{mg.L}^{-1}$  los resultados que obtuvieron en la investigación mostraron que a concentraciones de  $2\text{mg.L}^{-1}$  de zeatina presentó una mejor regeneración con un promedio de 5.28 brotes por explante en los cultivares Duke, Bluecrop y Berkeley, mientras que la menor capacidad de regeneración fue encontrada para Blueray en el medio suplementado con 2iP.

En una investigación realizada en Costa Rica por Brenes *et al.* (2015), en la micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium* spp.) A partir de segmentos foliares de dos procedencias, tuvieron por objetivo establecer un protocolo de micropropagación para 4 variedades de arándano a partir de hojas y de segmentos nodales, los que se sub cultivaron en un medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 0,5 y 1,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de zeatina para promover la proliferación de los brotes, los resultados indicaron que a partir de segmentos foliares a concentraciones de 0,5 y 1,0  $\text{mg.L}^{-1}$  de zeatina la variedad Bonita produjo el mayor

número de brotes con (4,5 y 4,8) respectivamente y el menor número de brotes presentó la variedad Woodard con un promedio de 3.8 brotes por explante, mientras que en la multiplicación a partir de segmentos nodales zeatina a concentración de  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  presentó un mayor número de brotes con un promedio de 4.9 en el cultivar Woodard.

Según Meiners *et al.* (2007), en los sistemas de regeneración *in vitro* eficaces para las especies de *Vaccinium* a partir de segmentos nodales, analizaron el comportamiento en un medio de cultivo WPM suplementado con zeatina, TDZ y 2-iP en diferentes concentraciones, donde los resultados indicaron que zeatina era superior a TDZ y 2iP en la formación de brotes adventicios, la concentración a  $20 \mu\text{M}$  de zeatina fue la más eficaz para promover la regeneración de brotes a concentraciones de  $18 \mu\text{M}$  de zeatina, el 51 % de los explantes establecidos originalmente desarrollaron brotes con hojas verdes y rojas, mientras que a  $9.1 \mu\text{M}$  de zeatina, 47 % de los segmentos nodales no generaron brotes, cerca de 53 % de los explantes en un medio suplementado con  $25 \mu\text{M}$  de 2-iP sobrevivieron y 40 % desarrollaron brotes con hojas rojizas y callos en las bases. Los brotes en un medio con 2-iP y TDZ mostraron retraso en el crecimiento.

En el estudio de Rodríguez y Morales (2015), quienes evaluaron la multiplicación *in vitro* de dos variedades de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.) Brigitta y Legacy, en respuesta a cinco densidades de los segmentos nodales (5, 10, 15, 20 y 25 mm) y cuatro volúmenes de medio (10, 20, 30 y 40 ml), utilizando para ambas variedades el medio WPM (Woody Plant Medium), donde Brigitta obtuvo mayor altura de brotes en densidades de 20 y 25mm y un volumen de 40 ml, mientras que Legacy obtuvo el mayor promedio de altura de brote en densidades de 15 y 20mm y un volumen de 40ml, para el número de brotes por frasco Brigitta obtuvo las mayores respuestas con densidades elevadas, superando los 40 brotes por frasco, en cambio la variedad Legacy presentó 25 brotes por frasco en un volumen de 30 ml de medio.

Emery *et al.* (1998), en la investigación “Los isómeros cis de las citoquininas predominantes en el *Cicer arietinum* a lo largo de su desarrollo”, afirmaron que la zeatina debido a la presencia de un doble enlace en la cadena lateral, la molécula tiene dos configuraciones: la forma predominantemente natural que es el isómero trans y cis-zeatina.

Por otro lado Staden y Drewes (1991), indicaron que el cisómero tiene una ocurrencia y una significación mucho más amplia y las preparaciones sintéticas de zeatina a menudo consisten en isómeros mixtos cis y trans, pero la forma cis tiene una actividad de citoquinina mucho más baja.

Gajdošová *et al.* (2011) & Leonard *et al.* (1971) Compararon la actividad de citoquininas del tipo cis-zeatina con la citoquinina de tipo Trans-zeatina en ensayos de actividad clásica en *Phaseolus* y en cultivo de células de tabaco, respectivamente, donde revelaron que cis-zeatina tiene poca actividad en comparación con trans-zeatina, que generalmente se considera la citoquinina natural más activa, mostrando en los bioensayos que trans-zeatina tiene 50 veces más actividad que cis-zeatina.

## **3.2. Base teórica**

### **3.2.1. Origen, historia y distribución del Arándano.**

Los arándanos azules y rojos, *Blueberry* y *cran Berry* en inglés, respectivamente son especies conocidas en casi todo el mundo y asociados con Norteamérica, pertenecen al género *Vaccinium*, el cual incluye alrededor de 450 especies que están distribuidas en el mundo desde las regiones más frías cerca del Círculo Ártico hasta regiones templadas, del trópico y neo trópico (Trehane, 2004).

Los arándanos azules son originarios de la parte Este de Norte América, su cultivo como un producto hortícola empezó en Estados Unidos, país que se mantiene como el principal productor y consumidor (Trehane, 2004).

Los arándanos del tipo „ojo de conejo“ (*Vaccinium ashei*) fueron los primeros en cultivarse a finales de siglo XIX en el Sur de Estados Unidos. La producción del arándano tipo “arbusto alto del norte” (*V. corymbosum* L.) Fue un fenómeno del siglo XX originado con la investigación pionera de Coville y Elizabeth White, en los comienzos de los 1900. Inicialmente, la expansión de la producción de este cultivo fue lenta (Moore, 1994).

### **3.2.2. Clasificación botánica**

Los arándanos constituyen un grupo de especies nativas principalmente del hemisferio Norte, que pertenecen al género *Vaccinium* de la familia de las Ericáceas. De las más de 30 especies del género *Vaccinium* solo un pequeño grupo tiene importancia comercial, en nuestro país las especies cultivadas son: *Vaccinium*



*corymbosum* (highbush o arándano alto) y *Vaccinium ashei* (rabbiteye u ojo de conejo) (Gordó, 2008).

De acuerdo con (Cronquist, 1981) taxonómicamente el arándano se clasifica de la siguiente manera:

- Reino : Vegetal
- División : Pterophytas
- Sub división : Angiosperma
- Clase : Dicotiledónea
- Orden : Ericales
- Familia : Ericaceae
- Sub familia : Vaccinieae
- Género : *Vaccinium*
- Especie : *Vaccinium corymbosum*

### 3.2.3. Morfología

**a. Raíces:** El sistema radical es superficial, situándose el 80% de éste en los primeros 40 cm, tiene raíces finas y fibrosas que se caracterizan por la ausencia de pelos absorbentes, entre las raíces y la parte aérea se encuentra la corona, que tiene la capacidad de emitir brotes, en la mayoría de los casos se asocia de forma natural con una micorriza formando una simbiosis, traduciéndose ésta en un mayor desarrollo vegetativo, es sensible al encharcamiento en suelos pesados (García, 2015).

**b. Tallos:** Los tallos de un año son llamados cañas, estos tallos o cañas se originan de yemas localizadas sobre la corona, la cual es un área de transición entre los sistemas vasculares morfológicamente distintos de la raíz y de la caña (Gough, 1994).

**c. Hojas:** Pueden alcanzar 75 mm de longitud y pueden tener pelos finos en el envés, tienen un grosor de 2.2. mm y contienen varias capas estructurales entre las epidermis; la epidermis superior se compone por células simples y transparentes, debajo de esto hay una doble capa de células en empalizada, otra área contiene células de parénquima, llamada mesófilo esponjoso, el cual contiene cloroplastos, su forma varía desde elípticas angostas a ovaladas, el haz puede ser opaco o brillante, rugoso o suave (Gough, 1994).

**d. Yemas vegetativas:** Son pequeñas de 4 mm de longitud aproximadamente y contiene un ápice que se extiende de 80-40 micrómetros y 120 micrómetros de diámetro. Se ubican en el sector medio y basal del brote (o ramilla de invierno), y a partir de ellas se originaran los brotes normales de la siguiente temporada (Bañados, 2007).

**e. Flores:** Axilares o terminales, en racimos de 6 a 10 en cada yema, sépalos persistentes, corola acampanada blanca con tonos rosas en algunos cultivares, formada por 4-5 pétalos fusionados, 8 a 10 estambres con anteras aristadas o no, prolongadas en tubos terminales con una abertura en el ápice, un pistilo simple, ovario ínfero, de 4 a 10 lóculos. El número de yemas de flor que puede desarrollarse en una rama de un arbusto del grupo “highbush” parece estar relacionado con el grosor de la rama, con el cultivar, así como por la influencia de varios reguladores de crecimiento (Bañados, 2007).

**f. Fruto:** Es una falsa baya esférica de 1 a 3 cm de diámetro, con un peso de 0,5 a 4,0 g y varias semillas en su interior, 20 a 100, cuyo número está relacionado de forma positiva con el tamaño del fruto. Los frutos, a medida que maduran, pasan por distintos grados de color, adquiriendo el tono azul característico al finalizar la maduración, a su vez, la epidermis del fruto está cubierta por secreciones cerosas, que le dan una terminación muy atractiva, los frutos más cercanos a las ramas son más grandes que los distales, y su tamaño se ha relacionado también con el vigor de la rama, es decir, ramas más vigorosas generalmente producen frutos mayores (García, 2015).

#### **3.2.4. Especies**

Arándano Negro (*Vaccinium uliginosum*), se encuentra en el hemisferio norte, muy abundante en el nivel del mar, en regiones más frías de Europa, Asia y América, hasta más de 3000 metros en las montañas del sur de estas regiones, se trata de un arbusto que difícilmente pasa el medio metro de altura, siendo de 15 a 20 cm su altura habitual, crece en suelos ácidos de la tundra, zonas pantanosas y bosques de coníferas (pinos), sus frutos son negros con pulpa blanca y sus flores rosa pálido, florece en primavera y fructifica en verano, no se suele cultivar, aunque se recogen los frutos en forma silvestre (Romero, 2016).

Arándano Rojo (*Vaccinium vitis-macrocarpon*), es un arbusto enano o enredadera leñosa, de tipo perenne, de crecimiento lento y con una altura de 10 a 20 cm. Es nativa del este de Estados Unidos, aunque se han introducido plantas silvestres en la Costa del Pacífico, el 30% de los terrenos destinados a la producción de arándano comercial, son selecciones de la planta silvestre de *V. macrocarpon* (Bryla y Strik, 2007), los frutos son redondeados y rojizos y aparecen a finales de otoño, su sabor es muy ácido por lo que se utiliza fundamentalmente en la elaboración de compotas y mermeladas (Garrido, 2014).

Arándano Azul (*Vaccinium corimbosum*). Originaria de la zona Noreste de Estados Unidos, se caracteriza por sus hojas caducas, que adquieren un tono escarlata, al llegar el otoño, es un arbusto de aspecto vertical, que alcanza 1.8 metros de altura, con flores rocosas e inflorescencias de color rosa (Romero, 2016), su fruto corresponde a una baya casi esférica que varía en tamaño desde 0,7 a 1,5 cm de diámetro, dependiendo de la variedad, su color va desde azul claro hasta un negro intenso, posee secreciones cerosas que le dan una terminación atractiva (Buzeta, 1997).

### 3.2.5. Variedades de arándano

**a. Legacy:** variedad que tiene requerimientos de frío de aproximadamente entre 500 a 600 horas, los frutos son de medianos a grandes, firmes y de buen sabor, con una marcada cicatriz del pedúnculo, es una variedad bien catalogada, producto de su alta producción, el arbusto mantiene sus hojas en invierno, existen huertos que llegan a los 18 a 20 t/ha al 4o-5o año. Presenta una floración temprana y larga, lo que la hace propensa a hongos de flor, la fruta puede presentar partiduras con precipitaciones abundantes, se adapta a la mayoría de las zonas productivas (Gonzales & Morales, 2017).

**b. Star:** requiere un mínimo de 400 horas de frío, produce fruta muy temprano, de gran tamaño, dulce y color azul claro, de excelente sabor y de fácil cosecha. La planta tiene hábito de crecimiento ligeramente abierto y de vigor moderado. La floración ocurre ligeramente después de O'Neal y Misty, pero la fruta madura en conjunto con O'Neal y antes que Misty. La maduración es en forma concentrada, con fruta con calibres promedio de entre 14 - 16mm. Se requiere la polinización cruzada con otros

cultivares para mejorar la producción, siendo O'Neal, Santa Fe y Emerald sus polinizadores naturales (Gonzales & Morales, 2017).

**c. Biloxi:** Requiere un mínimo de 400 horas de frío. Es de producción temprana, madura justo detrás de O'Neal y Star. Florece muy temprano, por lo que puede ser afectada por heladas, tiene fruta de mediano tamaño, de color azul claro, muy firme y de excelente sabor, la planta es de hábito erecto, muy vigoroso y productivo (Carmen & Abel, 2017).

**d. Misty:** tiene un requerimiento de entre 150 a 300 horas de frío, fruta de mediana a grande, de color azul claro. Es firme y de excelente sabor. Produce fruta muy temprano y puede tener una segunda cosecha en menor cantidad durante el otoño. Las plantas tienen un hábito de crecimiento erecto, arbustivo y son moderadamente vigorosas. La planta tiende a sobrecargar, por lo que es necesario podar anualmente y aliviar el estrés por carga, especialmente en plantas jóvenes. Presenta un bajo desarrollo de hojas en inviernos cálidos (Gonzales *et al.*, 2017).

**e. Bluecrop:** Es una variedad que requiere entre 800 – 1200 horas de frío, producen 1500 a 2000g de fruta, aproximadamente, es una variedad auto fértil, produce bayas de mayor tamaño cuando se planta junto a otras variedades, sus frutos son grandes de color azul claro y excelente calidad. La planta es vigorosa y de hábito de crecimiento erecto, crece hasta 1.8m. permite intervalos de cosecha cada 4 o 5 días sin problemas de firmeza en la fruta; sin embargo, presenta una floración larga, por lo que la cosecha es más escalonada, requiriendo un mayor número de pasadas. Bluecrop necesita polinización cruzada con otra variedad con necesidades de frío similar, las buenas opciones de polinizantes pueden ser O'Neal y Star (Jin *et al.*, 2011).

**f. Esmerald:** tiene bajos requerimientos de frío, estimado en 250 horas, la fruta es muy grande, firme, azul claro con excelente sabor y una pequeña cicatriz. La planta es vigorosa y de hábito abierto, con buena adaptación a suelos pesados o de mal drenaje, por lo tanto, presenta resistencia a *Phytophthora* y enfermedades de la madera, es muy productiva, puede producir una cierta cantidad de frutos en el otoño sin reducir la producción de primavera (Bryla & Strik, 2007).

### **3.2.6. Propagación del Arándano**

La propagación de arándano se ha realizado preferentemente de dos maneras, el enraizamiento de esquejes de tallo y la micropropagación. En Chile, durante los comienzos de las plantaciones de arándano se utilizó masivamente el enraizamiento de esquejes donde muchos productores enraizaban el material sobrante de la poda invernal, siendo en la última década donde la propagación de plantas a partir de tejidos ha tenido gran auge, la principal ventaja que ofrece este tipo de sistema se basa en la obtención de una gran cantidad de plantas, menor tiempo y libres de agentes patógenos como los virus, hongos y otros. También se le atribuido alargar la vida productiva de la plantas, poseer una mejor estructura y evitar una temprana floración (AIANER, 2013).

#### **3.2.6.1. Propagación *in vitro*.**

La propagación clonal de plantas fue originalmente desarrollada como una herramienta de investigación para estudiar la fisiología y la bioquímica de las plantas, pero se observó que la técnica tenía un alto potencial comercial, se le llamó micro propagación debido a la miniaturización del proceso, la micropropagación fue la primera técnica en utilizarse con fines económicos y actualmente es una tecnología industrial ampliamente utilizada alrededor del mundo (Bhojwani & Dantu, 2013), la micropropagación es la técnica más aplicada debido a su enorme productividad comparada con las técnicas tradicionales y se basa en la producción de tejidos estériles, la estimulación de la regeneración de tejidos vegetales, el rápido crecimiento de las plántulas jóvenes, enraizamiento de las plántulas y su adaptación en condiciones normales de suelo (Collin & Edwards, 1998).

El cultivo de tejidos vegetales o propagación *in vitro* es la ciencia del crecimiento de células vegetales, tejidos u órganos aislados de una planta madre, en medio artificial con condiciones controladas, en algunos casos se puede conservar un organismo completo (Endress, 1994). El cultivo de tejidos vegetales incluye las técnicas y métodos que permiten cumplir con algunos objetivos prácticos ya que ofrece sistemas modelo para el estudio de la fisiología, bioquímica y genética vegetal (Pérez *et al.*, 1999). El requisito para que funcionen estos métodos es la total potencia morfológica y química de cada célula vegetal (Thangadural, 2007).

## **Fases del cultivo *in vitro***

El proceso de cultivo *in vitro* incluye cinco fases que son:

### **Fase I. Preparación de la planta madre**

Para poder establecer el cultivo en condiciones de asepsia, se deben obtener explantes con un nivel nutricional y un grado de desarrollo adecuado. Para obtener estos explantes es recomendable mantener a las plantas madre un período de tiempo, que puede oscilar entre unas semanas o varios meses, en un invernadero, en el que se va a intentar cultivar la planta en condiciones sanitarias óptimas y con un control de la nutrición, del fotoperiodo y de la radiación recibida (Rosell, 1990).

### **Fase II. Establecimiento del cultivo en condiciones de asepsia**

Esta fase consiste básicamente en la introducción de los explantos en el medio de cultivo en condiciones de esterilidad y la desinfección de los tejidos para iniciar un cultivo acéptico (Roca & Mroginski, 1991). Los explantes tomados de las plantas jóvenes o zonas de crecimiento activas tienen un mejor desarrollo que aquellos tomados de plantas adultas o yemas en reposo, a medida que es más joven y menos diferenciado el tejido que se va a implantar, mejor será la respuesta *in vitro* (Villalobos & García, 1982).

El tamaño del explante es un factor importante que influye en la desinfección y regeneración de plantas, a medida que el explante es más pequeño es menor el riesgo de contaminación y más difícil la regeneración, mientras que a mayor tamaño del explante son mayores las probabilidades de contaminación y más rápido el crecimiento y la regeneración directa de órganos (Roca *et al.*, 1991).

### **Fase III. Multiplicación de los brotes**

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción. Es importante señalar que en esta etapa, cualquiera sea la vía de regeneración, es conveniente evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal, en esta fase los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento y las condiciones de crecimiento juegan un papel importante sobre la multiplicación clonal de los explantos (Olmos *et al.*, 2004).

#### **Fase IV. Enraizamiento**

En esta etapa se produce la formación de raíces. En las especies herbáceas es relativamente fácil, mientras que en las especies leñosas es complicado por su limitada capacidad rizo-génica. El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como ex vitro. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (auxinas) para promover la rizogénesis. Se transfieren los brotes obtenidos durante la fase de multiplicación a un medio libre de reguladores de crecimiento o que sólo contenga auxinas. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. Medios con baja concentración salina (Gresshoff & Doy, 1972).

El enraizamiento ex vitro permite que el enraizamiento y aclimatación se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Bajo condiciones ex vitro se usan diferentes sustratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales deben estar debidamente esterilizados, con este método es necesario que los brotes tengan las hojas bien desarrolladas, ya que deben realizar fotosíntesis para que la planta tenga una fuente de energía para enraizar y desarrollarse (Gresshoff & Doy, 1972).

#### **Fase V. Aclimatación:**

La micropropagación ha sido utilizada para la multiplicación rápida y masiva de muchas especies vegetales, sin embargo, en muchos casos, su uso se ve restringido por el alto porcentaje de pérdidas o daños en el momento en que las plantas son transferidas a condiciones ex vitro (invernadero o campo). Durante el cultivo *in vitro*, las plantas crecen bajo condiciones muy especiales: envases casi totalmente cerrados, donde la humedad relativa es alta, y la irradiación es más baja que en cultivos tradicionales. El uso de envases sellados, con el objeto de prevenir contaminaciones, evita la turbulencia de aire, condicionando el flujo de CO<sub>2</sub> y el intercambio gaseoso con el medio ambiente. La incorporación de glúcidos al medio de cultivo como fuente de carbono y energía, aumenta el riesgo de contaminación con hongos y bacterias (Altman & Loberant, 1998).

Durante la aclimatización pueden diferenciarse dos períodos: un período de adaptación con poco crecimiento de los brotes y baja formación de raíces, seguido de un período de rápido crecimiento de raíces y parte aérea (Pospíšilová *et al.*, 1999).

### **3.7.2.2. Medio de cultivo**

La elección y formulación del medio de cultivo son otros factores importantes que determinan la respuesta del explante y el éxito del cultivo de tejidos vegetales. Se puede considerar que los medios de cultivo están formados principalmente, de dos grupos de componentes: los esenciales y los opcionales. Los esenciales son los nutrientes que los tejidos vegetales necesitan para su desarrollo (nutrientes minerales, fuente de carbono y vitaminas). Los opcionales no son indispensables, ya que no se necesitan para mantener vivo al tejido vegetal, pero influyen en gran medida en la respuesta de los cultivos *in vitro*, aquí encontramos a los reguladores de crecimiento vegetal (Pérez *et al.*, 1999).

Los medios de cultivo poseen una serie de componentes generales y específicos cuya presencia, combinación y concentración dependerá de los objetivos que se persigan en su utilización. La composición del medio de es uno de los principales factores a tener en cuenta para lograr unas respuestas morfológicas deseadas, estimular la diferenciación y conducir el crecimiento de tejidos vegetales *in vitro* (Sharry *et al.*, 2015).

### **3.7.2.3. Reguladores de crecimiento**

Son compuestos químicos orgánicos cuya función es regulatoria, más que nutricional en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. También se conocen como fitohormonas, generalmente son activos a muy bajas concentraciones y tienen la capacidad de modificar el crecimiento vegetal. Los reguladores de crecimiento muestran efectos muy significativos en la respuesta de los tejidos vegetales, por que determinan hasta cierto grado los patrones de desarrollo y los resultados obtenidos de los mismos. Los producidos de forma natural se denominan endógenos y los que se adicionan de forma externa exógenos, son muy importantes en campos como la agricultura y el cultivo de tejidos vegetales por lo que deben de ser manejados apropiadamente (Bhojwani, & Dantu, 2013).



(Berrior & Berthoul, 1987) Menciona que un regulador de crecimiento es un compuesto orgánico que en pequeñas cantidades, promueve, inhibe o modifican cualitativamente el crecimiento y desarrollo del tejido. Los efectos de los reguladores de crecimiento no son absolutos y específicos. Generalmente las respuestas de las células, tejidos y órganos *in vitro* pueden variar de acuerdo con las condiciones de cultivo, tipo de explante, genotipo de la planta y medio de cultivo, la clasificación principal de los reguladores de crecimiento se realiza en cinco grupos principales dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico que son: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno (George, Hall & Kler, 2008).

Las auxinas y las citoquininas son por mucho los componentes más importantes para regular el crecimiento y morfogénesis de los tejidos vegetales y de los cultivos de órganos, por lo tanto son los reguladores de crecimiento más utilizados en el cultivo *in vitro*; en estas clases, se han descubierto reguladores sintéticos con la misma actividad biológica que igualan o exceden a las sustancias naturales. Actualmente no existen opciones sintéticas para las giberelinas y el ácido abscísico (George *et al.*, 2008).

#### **3.7.2.4. Citoquininas**

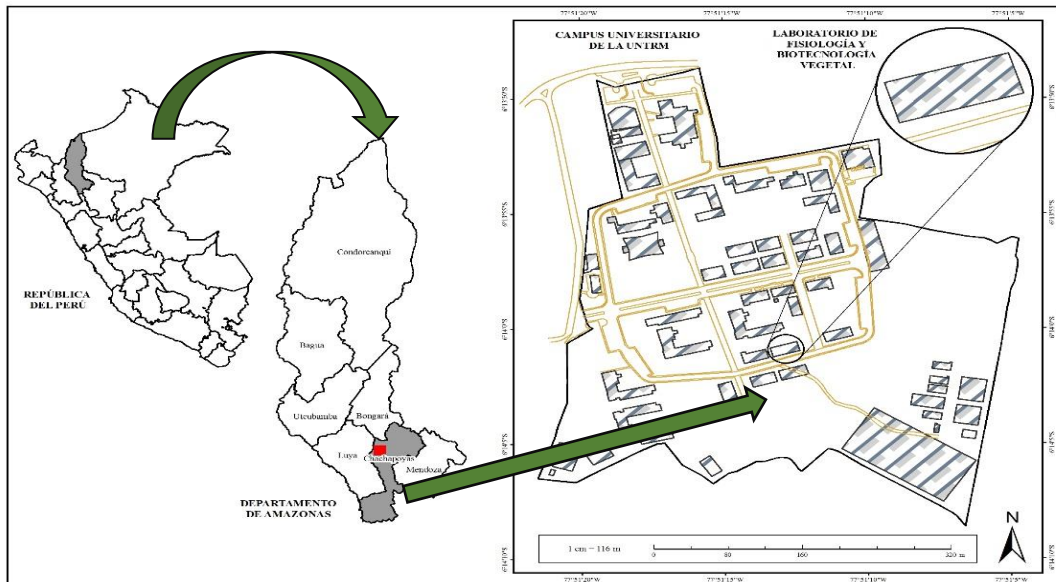
Las citocininas se definen por su capacidad para promover la división y crecimiento celular *in vitro* de tejidos callosos (Endress, 1994).

Las citocininas naturales generalmente son derivados de adenina y se presenta en las plantas como nucleósidos y nucleótidos y se sintetizan en tejidos jóvenes y raíces, tienen la capacidad de estimular la síntesis de proteínas, participan en el control del ciclo celular estimulando y regulando la división celular y rompen la latencia de las yemas axilares, modificando la dominancia apical y la diferenciación de los brotes, en plantas completas promueven la brotación, estimulan la expansión de las hojas y retardan la senescencia, las citoquininas comúnmente utilizadas en el cultivo de tejidos son Benciladenina (BA), Cinetina (CIN), Isopentiladenina (2iP), el Tidiazurón (TDZ), Isoprenoides (Zeatina y sus derivados trans y Cis) (Bhojwani & Dantu, 2013).

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Ubicación del área de estudio

La investigación se desarrolló en el laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES) de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, ubicado en la Región Amazonas, provincia de Chachapoyas.



**Figura 1.** Ubicación geográfica del área de estudio. (Mapa de la ciudad universitaria UNTRM-A - Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal)

### 4.2. Diseño de contrastación de la hipótesis

Para la contrastación de la hipótesis del trabajo de investigación los tratamientos fueron distribuidos empleando un Diseño Completo al Azar (DCA), con tres factores con una distribución de 48 tratamientos y 10 repeticiones.

### 4.3. Diseño de tratamientos

La estructura de tratamientos fue 4Ax3Bx4C, el factor A (Variedades de arándano) con cuatro niveles (Biloxi, Legacy, Bluecrop y Star), el factor B (Citoquininas) con tres niveles (zeatina, trans-zeatina y cis-zeatina) y factor C (Concentración de citoquininas) con cuatro niveles (0.0mg/L, 1.0 mg/L, 2.0 mg/L y 4.0 mg/L), los cuales interactuaron para obtener los 48 tratamientos como se muestra en la Tabla 1.

Variedades*	Citoquininas*	Concentración De citoquinina *	Tratamientos
V1	F1	C1	T1
		C2	T2
		C3	T3
		C4	T4
	F2	C1	T5
		C2	T6
		C3	T7
		C4	T8
	F3	C1	T9
		C2	T10
		C3	T11
		C4	T12
V2	F1	C1	T13
		C2	T14
		C3	T15
		C4	T16
	F2	C1	T17
		C2	T18
		C3	T19
		C4	T20
	F3	C1	T21
		C2	T22
		C3	T23
		C4	T24
V3	F1	C1	T25
		C2	T26
		C3	T27
		C4	T28
	F2	C1	T29
		C2	T30
		C3	T31
		C4	T32
	F3	C1	T33
		C2	T34
		C3	T35
		C4	T36
V4	F1	C1	T37
		C2	T38
		C3	T39
		C4	T40
	F2	C1	T41
		C2	T42
		C3	T43
		C4	T44
	F3	C1	T45
		C2	T46
		C3	T47
		C4	T48

**Tabla 1.** Diseño de los tratamientos 4Ax3Bx4C. \*Variedades = V1: Biloxi, V2: Legacy, V3: Bluecrop, V4: Star. \*Citoquininas = F1: zeatina; F2: trans-zeatina; F3: cis-zeatina. \*Concentración = C1: 0.0 mg/L, C2: 1.0 mg/L, C3: 2.0 mg/L, C4: 4.0 mg/L.

R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
T10	T24	T48	T15	T46	T15	T18	T12	T14	T17
T24	T36	T9	T23	T45	T29	T4	T44	T17	T2
T1	T34	T36	T3	T48	T2	T23	T19	T26	T47
T27	T25	T19	T24	T33	T30	T21	T47	T48	T16
T36	T38	T39	T40	T43	T33	T26	T13	T1	T28
T21	T40	T10	T1	T47	T3	T24	T46	T27	T11
T40	T9	T31	T46	T21	T45	T19	T18	T15	T34
T9	T42	T37	T16	T34	T14	T33	T31	T47	T10
T41	T35	T2	T36	T22	T27	T12	T32	T34	T31
T23	T37	T32	T2	T1	T46	T35	T33	T16	T19
T47	T10	T38	T41	T40	T32	T38	T2	T30	T45
T13	T5	T20	T47	T23	T21	T14	T42	T25	T11
T48	T26	T5	T9	T11	T47	T40	T1	T28	T22
T26	T44	T35	T45	T37	T28	T1	T16	T3	T33
T3	T29	T41	T26	T36	T1	T17	T45	T33	T48
T37	T12	T42	T39	T44	T17	T39	T11	T43	T29
T20	T1	T12	T7	T2	T44	T37	T34	T23	T14
T2	T20	T18	T37	T12	T31	T25	T17	T29	T46
T35	T27	T40	T25	T35	T16	T2	T29	T42	T18
T28	T33	T11	T20	T42	T9	T22	T6	T2	T27
T15	T6	T33	T5	T3	T22	T20	T43	T24	T4
T11	T8	T1	T13	T5	T4	T32	T20	T19	T38
T22	T39	T30	T44	T18	T36	T3	T14	T7	T15
T18	T23	T21	T14	T41	T34	T13	T30	T31	T40
T33	T18	T44	T21	T4	T10	T30	T5	T32	T9
T39	T28	T8	T42	T13	T20	T16	T15	T18	T44
T6	T41	T28	T34	T24	T42	T8	T21	T12	T3
T31	T7	T22	T4	T28	T11	T36	T9	T38	T25
T42	T19	T25	T17	T38	T35	T34	T3	T13	T30
T7	T43	T3	T38	T9	T6	T15	T10	T35	T8
T43	T31	T24	T12	T20	T48	T27	T38	T39	T35
T25	T2	T43	T22	T31	T19	T42	T26	T9	T12
T12	T11	T34	T32	T10	T43	T31	T4	T40	T39
T38	T30	T14	T28	T39	T12	T5	T35	T4	T21
T16	T14	T29	T8	T19	T37	T44	T41	T46	T37
T32	T48	T4	T43	T8	T18	T46	T25	T44	T6
T4	T3	T26	T48	T29	T13	T7	T27	T8	T20
T45	T47	T16	T6	T25	T26	T10	T23	T41	T24
T14	T45	T47	T33	T14	T40	T43	T37	T6	T32
T19	T13	T45	T30	T7	T5	T11	T48	T22	T43
T34	T16	T13	T35	T17	T25	T45	T22	T11	T7
T8	T32	T46	T11	T27	T38	T41	T40	T45	T26
T44	T21	T7	T31	T6	T24	T28	T24	T5	T42
T17	T4	T27	T18	T30	T8	T6	T28	T36	T23
T46	T22	T15	T27	T16	T41	T48	T8	T20	T41
T30	T46	T17	T29	T26	T39	T47	T36	T10	T5
T5	T17	T6	T10	T15	T23	T29	T7	T37	T36
T29	T15	T23	T19	T32	T7	T9	T39	T21	T13

**Tabla 2.** Distribución de los tratamientos en un diseño completamente al azar. Se definieron 48 tratamientos de la interacción de las variedades de arándano, tipo de citoquinina y concentración, las cuales se aplicaron a las unidades experimentales mediante sorteo de tal forma que a cada repetición (R) le correspondió 48 tratamientos, obteniendo en total de 480 tratamientos para su respectiva evaluación.

#### **4.4. Métodos, técnicas e instrumentos de recolección de datos**

El proyecto de investigación se desarrolló de la siguiente manera:

##### **4.4.1. Fase de campo**

Para la fase de campo se trabajó según la metodología propuesta por Bonilla y Esquivel (2016) con algunas modificaciones para el desarrollo de la investigación.

##### **a. Ubicación de las plantas madres**

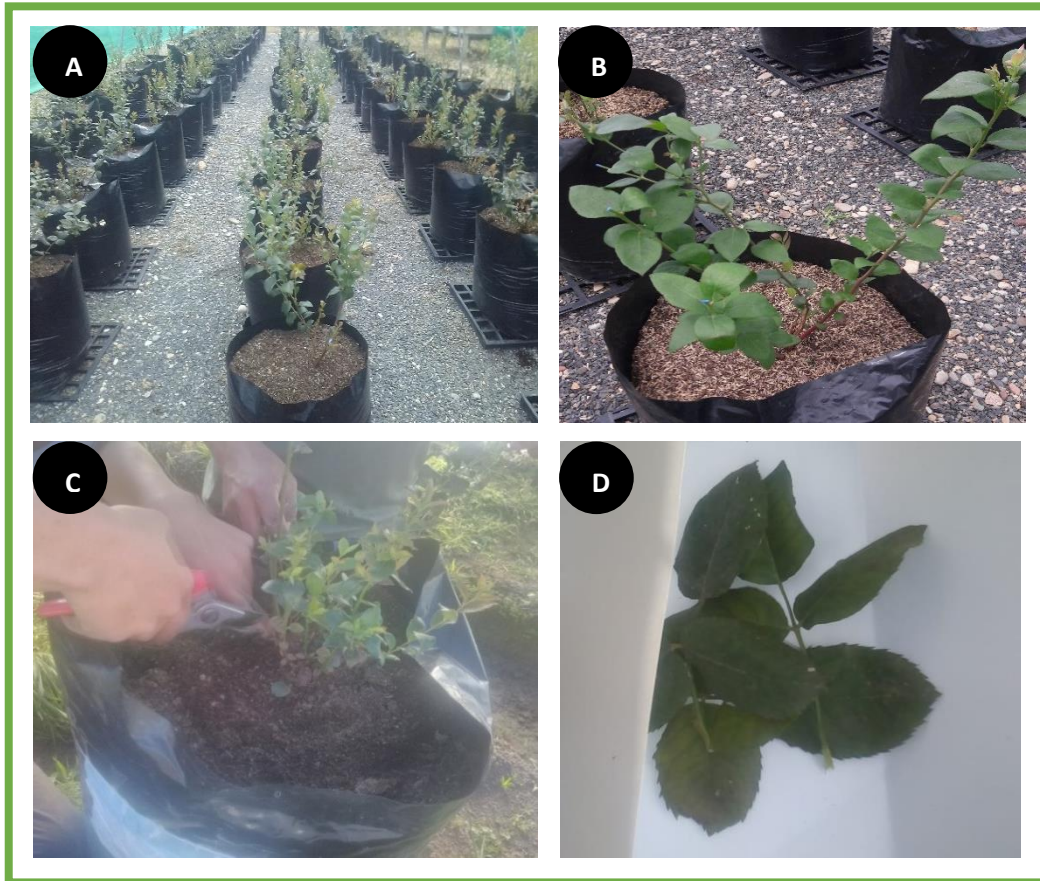
Las plantas madres seleccionadas de las cuatro variedades de arándano se mantuvieron instaladas en el invernadero de la estación experimental de Molinopampa, provincia de Chachapoyas de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas a una altitud de 2421 msnm, latitud: 06°12'20" Sur, longitud: 77°40'06" Oeste, estas plantas se mantuvieron en condiciones sanitarias óptimas y un control nutricional adecuado.



**Figura 2.** Imagen satelital. Ubicación de la estación experimental de Molinopampa (Google earth, s.f.)

##### **b. Selección y recolección del material biológico**

Se recolectaron tallos jóvenes de 10 a 15 cm. de longitud, poco lignificados, libres de plagas y enfermedades, que luego se envolvieron en papel toalla y se colocaron en un Cooler (Coleman de 41 x 58 x 34) para su traslado al laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.



**Figura 3.** Fase de campo; A. plantas madres de Arándano (*Vaccinium corymbosum*) instaladas en la estación experimental de Molinopampa, B. selección de la planta madre, C. recolección de los esquejes con el empleo de una tijera podadora, D. traslado de los esquejes recolectados al laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la UNTRM-A

#### **4.4.2. Fase de laboratorio**

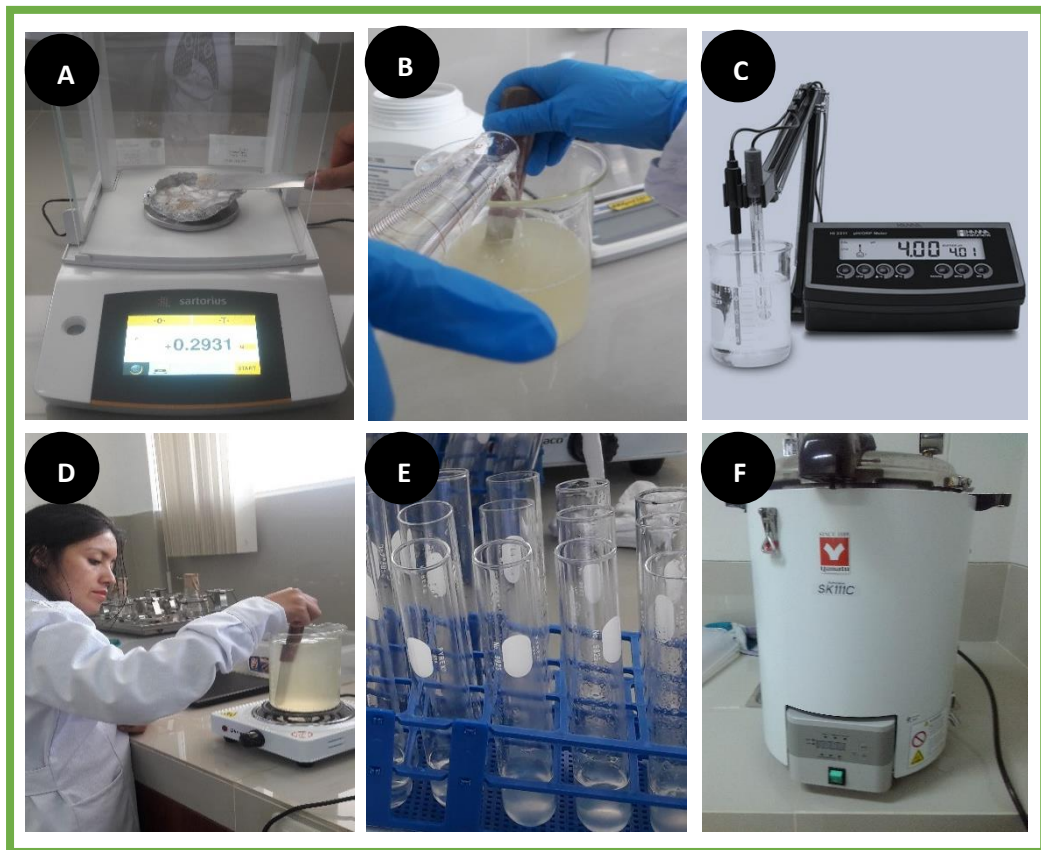
El trabajo de multiplicación *in vitro* a partir de segmentos nodales de cuatro variedades de arándano (*V. corymbosum*) se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas (UNTRM-A). Donde constó de dos etapas:

##### **4.4.2.1. Etapa de desinfección y establecimiento**

Para la etapa de desinfección y establecimiento se trabajó según la metodología propuesta por Brenes *et al.* (2015). Con algunas modificaciones para el desarrollo de la investigación.

### a. Preparación del medio de cultivo

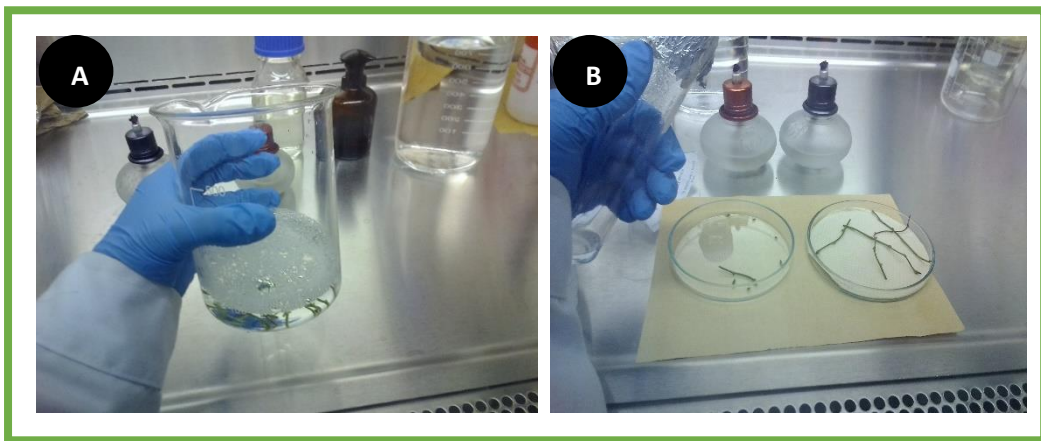
En un matraz de 1000ml con agua destilada estéril se agregó 2,41gr/1000ml de medio WPM (Woody Plant Media), desarrollado por Lloyd y McCown (1981), luego se agregó 30gr/1000ml de sacarosa y se agitó hasta tener una solución homogénea, se ajustó el pH en un rango de 5,2-5,3. Posteriormente se pasó a calentar la solución hasta que el agar quede totalmente disuelto, finalmente se vertió 3ml de solución a cada tubo de ensayo de 25mm de diámetro, se pasó a autoclavar a 120°C durante 20 minutos. Y se dejó enfriar a temperatura ambiente.



**Figura 4.** Preparación del medio de cultivo. A. peso de los insumos haciendo uso de una balanza analítica Sartorius, B. homogenización de la solución, C. ajuste del PH en un rango de 5.2 a 5.3, D. disolución de los insumos calentando la solución en una cocina eléctrica, E. distribución de 3ml de solución por cada tubo de ensayo F. autoclavado a 120°C durante 20 minutos.

## b. Desinfección del material vegetal seleccionado

A los tallos recolectados se eliminaron las hojas y se seccionaron en segmentos de 5 cm de longitud con 2 a 3 yemas axilares cada uno y se sometieron al siguiente procedimiento de desinfección superficial: 30 min en agua corriendo, luego en una cabina de flujo laminar (Biobase, modelo BBS-H1100), los segmentos se colocaron en alcohol de 70% con una agitación constante durante 1 min, seguido por inmersión en una solución NaOCl al 3% (v/v) con una gota de tween 20, y agitación durante 10 min. Luego se realizaron 3 enjuagues consecutivos con agua desionizada estéril durante 2 min cada uno.

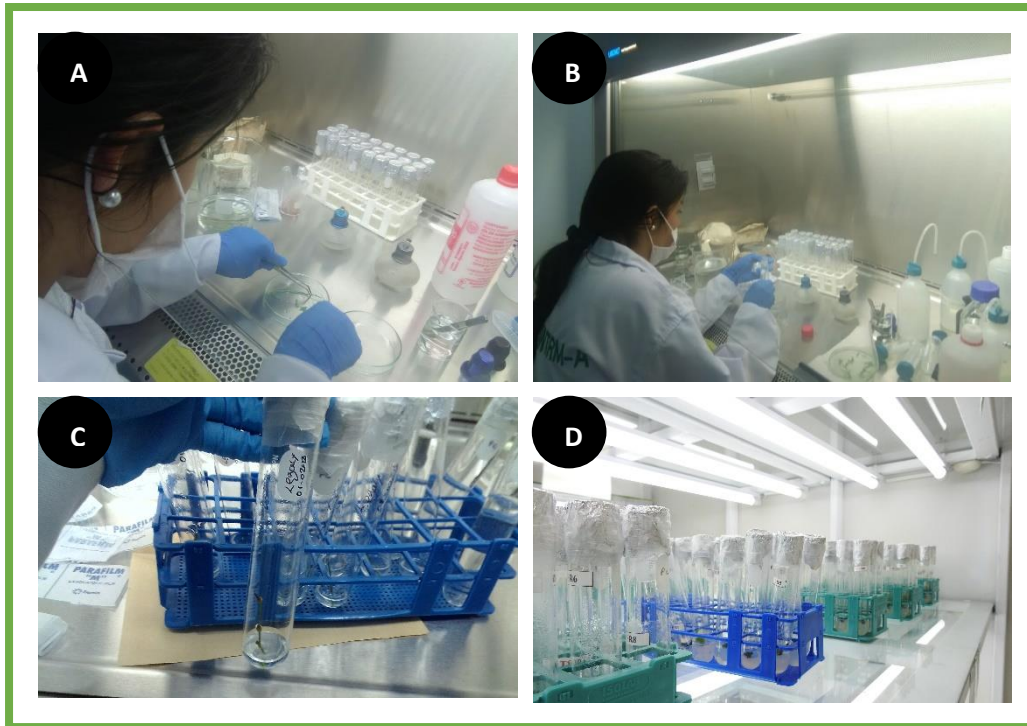


**Figura 5.** Desinfección del material vegetal seleccionado. A. Desinfección de los tallos con alcohol de 70% por 1min. NaOCl al 3% con dos gotas de tween 20. B. segmentos desinfectados colocados en placas petri desinfectados.

## c. Introducción de los segmentos nodales

Una vez desinfectados los segmentos nodales de *Vaccinium corymbosum* se cortaron los extremos de cada segmento y se cultivaron en los tubos de ensayo de 25 mm de diámetro con 3 ml de medio WPM (Woody Plant Medium). Se utilizaron 20 segmentos nodales por cada variedad, Finalmente se establecieron en un ambiente en condiciones de estricta asepsia por 45 días con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a temperatura ambiente.





**Figura 6.** Introducción de los segmentos nodales. A. Segmentación de los tallos desinfectados, B. introducción de los segmentos nodales a los tubos de ensayo con medio de cultivo, C. segmento de la variedad Legacy introducida en medio líquido de WPM, D. establecimiento de los segmentos nodales con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a temperatura ambiente.

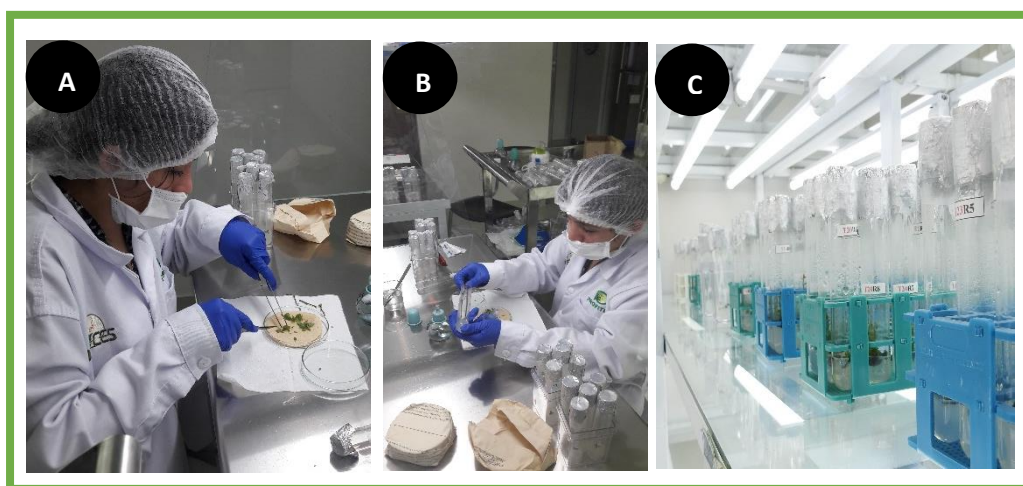
#### 4.4.2.2. Etapa de multiplicación *in vitro*

##### a. Preparación del medio de cultivo suplementado

Se trabajó con 2.41mg/1000ml de WPM (Woody Plant Medium) y 30gr/1000ml de sacarosa, con un pH ajustado de 5,2-5,3. Para la gelificación del medio se añadió Agar 8gr/1000ml. Y se agregó las citoquininas (zeatina, trans-zeatina y cis-zeatina) en diferentes concentraciones (0.0mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L y 4.0mg/L) según los tratamientos. Luego se pasó a calentar la solución hasta que el agar quede totalmente disuelto, posteriormente se vertió 8ml de solución a cada tubo de ensayo de 25mm de diámetro, finalmente se autoclavó durante 20 minutos a 120°C. Y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

## b. Multiplicación

A los 45 días de establecimiento los brotes asépticos y vigorosos fueron seccionados en segmentos nodales de 1cm de longitud con una sola yema y se cultivaron un segmento nodal por cada tubo de ensayo con 8 ml de medio suplementado con las diferentes citoquininas (zeatina, trans-zeatina y cis-zeatina) y concentraciones (0.0mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L y 4,0mg/L) correspondiente para cada tratamiento. El material cultivado se colocó en un ambiente en condiciones de estricta asepsia para ser evaluados con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad y una intensidad lumínica de 850 lux. A temperatura ambiente.



**Figura 7.** Multiplicación *in vitro*, A. Segmentación de los brotes en un 1cm con una sola yema, B. Introducción de los segmentos en tubos de ensayo con 8 ml de medio suplementado con las diferentes citoquininas, C. establecimiento de los segmentos con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad a temperatura ambiente.

### 4.4.3. Evaluaciones

Una vez transcurrido 10 días del inicio del experimento se realizó la primera evaluación de altura de brote, número de brotes por explante, número de hojas por brote y número de ramificaciones, sin manipular directamente a la plántula para evitar problemas de contaminación, estas evaluaciones se realizaron cada 10 días por un periodo de 50 días a partir del momento de la instalación del experimento.

#### **4.4.3.1. Número de brotes**

Mediante la multiplicación *in vitro* es posible obtener brotes a partir de explantes, la cual bajo condiciones adecuadas de luz, temperatura y nutrientes es capaz de generar numerables brotes nuevos (Rodríguez *et al.*, 2015), en la investigación se realizaron cinco evaluaciones por un periodo de 50 días la primera evaluación se realizó a los 10 días de instalado el experimento, las evaluaciones consistieron en cuantificar los brotes desarrollados en cada tratamiento mediante la observación visual y tomar registro de cada uno de los tratamientos evaluados.

#### **4.4.3.2. Número de hojas**

Se evaluó el número de hojas regeneradas en el transcurso de la incubación de las plántulas, este parámetro se evaluó, contando el número de hojas por tratamientos en los 48 tratamientos de las 10 repeticiones, cabe resaltar que la actividad de las plantas se refleja en la continuidad de crecimiento de los brotes y sus hojas, lo cual repercute en mayor área foliar para maximizar la eficiencia fotosintética de los cultivos (Rodríguez *et al.*, 2015).

#### **4.4.3.3. Altura de planta (cm)**

Se tomaron registros de altura de planta a los diez días de instalado el experimento, las mediciones se hicieron desde el cuello hasta el brote superior del explante, dicha magnitud se expresó en centímetros (cm), luego se obtuvo la media general de los 48 tratamientos de cada unidad experimental, este parámetro se evaluó en 50 días durante 5 veces (Brenes *et al.*, 2015).

#### **4.4.3.4. Ramificaciones**

Esta evaluación al igual que los demás parámetros se realizó cada diez días durante un lapso de 50 días, la primera evaluación se realizó a los 10 días de instalado el experimento, esta evaluación consistió en cuantificar el número de ramificaciones de cada tratamiento en las diez repeticiones mediante la observación visual.



**Figura 8.** Evaluación de altura de los brotes en (cm). Evaluación realizada a los 50 días de instalado el experimento, empleando como medidor un vernier digital milimetrado.

#### **4.5. Análisis de datos**

Los datos que se obtuvieron de las respectivas evaluaciones de los 48 tratamientos, se trabajó utilizando el software estadístico InfoStat versión 2017.

Para ver las diferencias a nivel de dosis, tipo de citoquinina, variedades de arándano y poder determinar la concentración de cis-zeatina que tenga un mejor comportamiento durante la multiplicación *in vitro*, se realizó la prueba de Wilk-Shapiro para verificar la normalidad de los datos, puesto que los datos no presentaron una distribución normal se realizó el análisis de varianza no paramétrica Kruskal Wallis para ver si existe o no diferencia significativa.

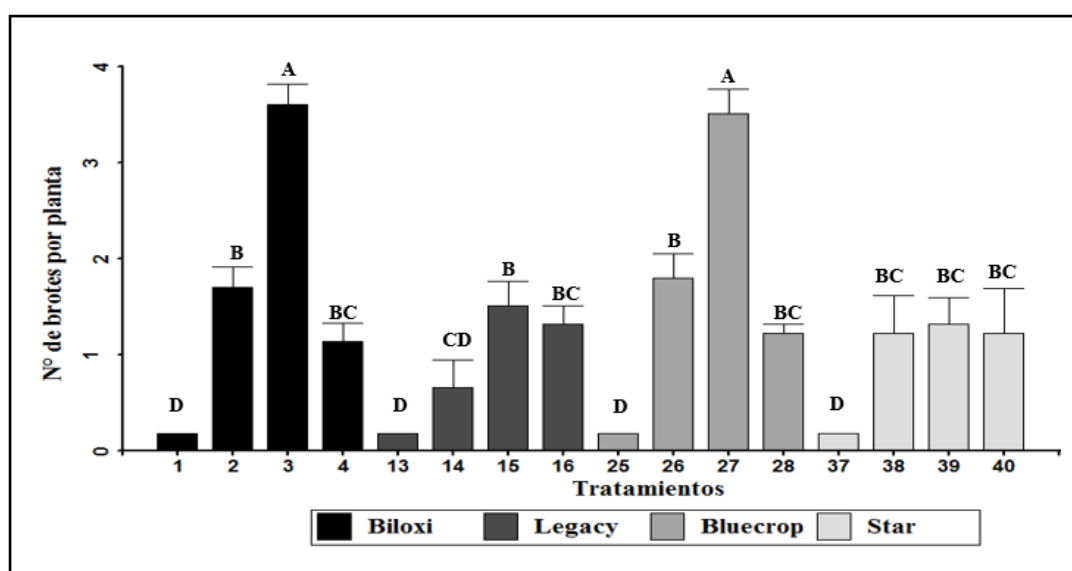
Para determinar la relación de similitud de los tratamientos con respecto a las variables número de brotes, hojas, ramificaciones y altura de planta, se trabajó con el índice de Bray Curtis; teniendo como resultados la formación de conglomerados

## V. RESULTADOS

### 5.1 Determinación de la concentración de zeatina en la multiplicación *in vitro*, de segmentos nodales de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*)

#### 5.1.1 Número de brotes

En la figura 9, se muestra la comparación de las medias para la variable número de brotes en función a cuatro concentraciones de zeatina, donde se muestran 6 grupos homogéneos; de modo que el grupo con un mayor número de brotes estuvo conformado por los tratamientos T3 y T27, correspondiente a las variedades Biloxi y Bluecrop con promedios de 3.6 y 3.5 respectivamente, estos tratamientos difieren significativamente frente al resto, además se observó un segundo grupo conformado por los tratamientos T26, T2 y T15 con promedios de 1.7, 1.6 y 1.4 respectivamente; también un tercer grupo conformado por los tratamientos T16, T39, T40, T28, T38 y T4, presentando valores entre 1 a 1.4 brotes por planta, finalmente se muestra un grupo conformado por los tratamientos T1, T13, T25 y T37, los cuales no evidenciaron presencia de brotes durante la multiplicación *in-vitro*.

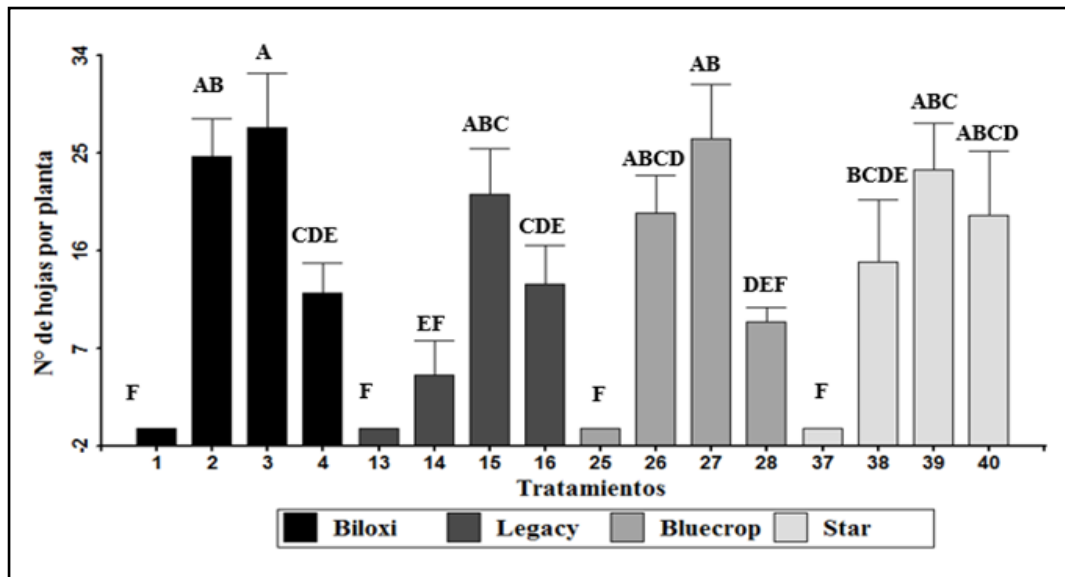


**Figura 9.** Número de brotes en función a cuatro concentraciones de zeatina

#### 5.1.2 Número de hojas

En cuanto a la variable número de hojas se muestra la formación de 9 grupos homogéneos correspondiente al promedio número de hojas, donde se observa que en el primer grupo conformado por el tratamiento T3 presentó un mayor número de hojas con un promedio de 27.7 difiriendo significativamente frente al resto de

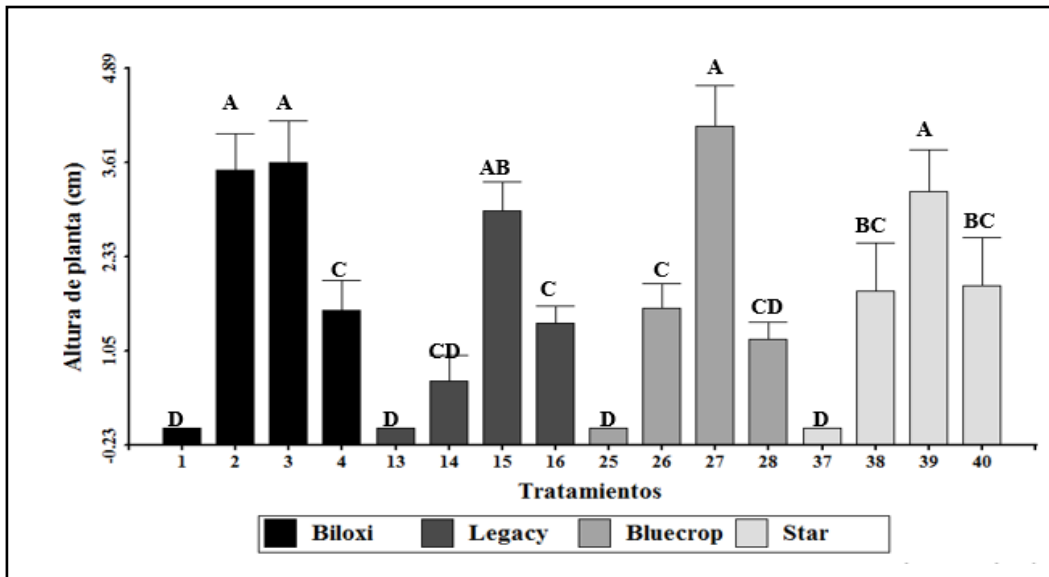
tratamientos, seguido por un segundo grupo conformado por los tratamientos T27 y T2 con promedios de 26.7 y 25.1 número de hojas respectivamente, un tercer grupo estuvo conformada por los tratamientos T15 y T39 con promedios de 21.6 y 23.9 respectivamente, estos tratamientos difieren frente a los grupos formados por los tratamientos T26 y T40 que presentaron promedios de 19.9 y 19.7, por otro lado se observa que los tratamientos T1, T13, T37 y T25 no difieren significativamente frente a los demás tratamientos, como se muestra en la figura 10.



**Figura 10.** Número de hojas en función a cuatro concentraciones de zeatina

### 5.1.3 Altura (cm)

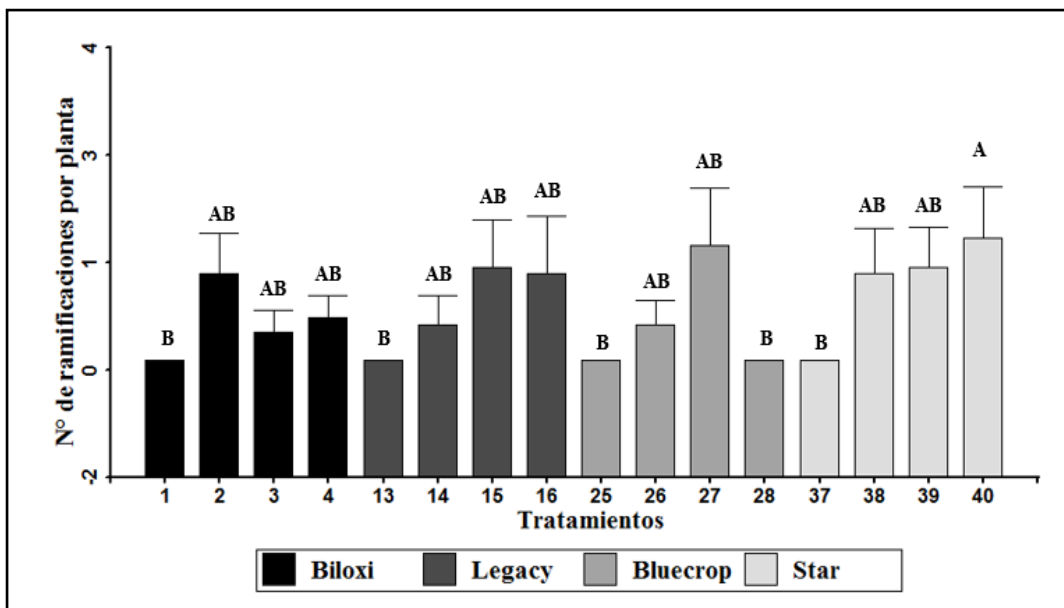
Los resultados en cuanto a esta variable, muestra la formación de 6 grupos homogéneos correspondiente al promedio altura de planta, donde se observa que el tratamiento T27 con un promedio de 4.1cm, difiere significativamente frente a los demás tratamientos, en otro grupo conformado por los tratamientos T3, T2, T39 y T15 no difieren significativamente, sin embargo estos tratamientos muestran un comportamiento diferente frente a los tratamientos T40 y T38, así mismo se muestra que los tratamiento T26, T4, y T16 muestra un comportamiento diferente frente a los tratamientos T28 y T14, por otro lado se observa que los tratamientos T25, T37, T1 y T13 no difieren significativamente frente a los demás tratamientos, figura 11.



**Figura 11.** Altura (cm) de planta en función a cuatro concentraciones de zeatina

### 5.1.4 Número de ramificaciones

La figura 12, muestra la formación de tres grupos homogéneos para la variable número de ramificaciones, donde se observa que la variedad Biloxi obtuvo un mayor número de ramificaciones a 1.0mg/L de Zeatina con un promedio de 1.2, la variedad Legacy y Bluecrop mostraron un mejor resultado con 2.0mg/L con un promedio de 1.3 y 1.6. Mientras que la variedad Star mostró un mejor resultado a 4.0mg/L de zeatina con un promedio de 1.7.

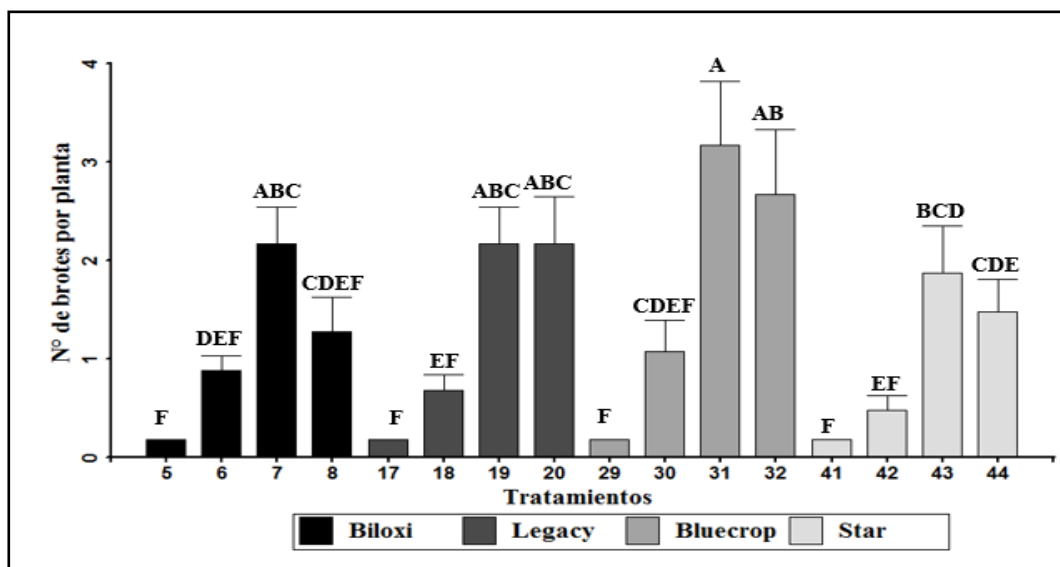


**Figura 12.** Número de ramificaciones en función a cuatro concentraciones de zeatina

## 5.2 Determinación de la concentración de trans-zeatina en la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*)

### 5.2.1. Número de brotes

Para la variable número de brotes en función a cuatro concentraciones de trans-zeatina, se muestran 9 grupos homogéneos; de modo que el grupo con un mayor número de brotes está conformado por el tratamiento T31 con un promedio de 3.5, seguido por el tratamiento T32 con un promedio de 2.5, estos tratamientos difieren significativamente frente al resto de los tratamientos, además se observó un tercer grupo conformado por los tratamientos T19, T20 y T7 presentando promedios de 2.0 brotes por planta, además se muestra la formación de 6 grupos homogéneos con promedios de 0 a 1.7 brotes por planta, como se muestra en la figura 13.



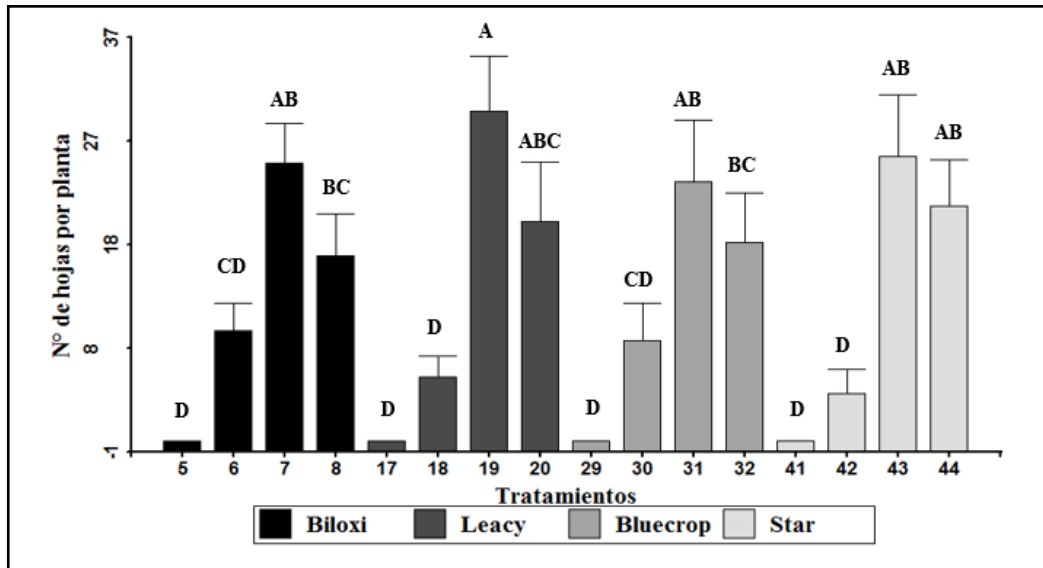
**Figura 13.** Número de brotes en función a cuatro concentraciones de trans-zeatina.

### 5.2.2. Número de hojas

En cuanto al promedio número de hojas se muestra la formación de 6 grupos homogéneos, representada en la figura 14, donde se observa que el tratamientos T19 difiere significativamente frente a los demás tratamientos, mostrando el mejor comportamiento con un promedio de 30.1 número de hojas por planta, así mismo se muestra que las variedades Biloxi, Legacy, Bluecrop y Star bajo la aplicación de 1.0mg/L, presentaron un menor número de hojas mostrando un promedio de 10.1, 5.8, 9.2 y 4.3 respectivamente, las concentraciones a 4.0mg/L, mostraron un efecto intermedio en las cuatro variedades de arándano, mientras que a concentraciones de



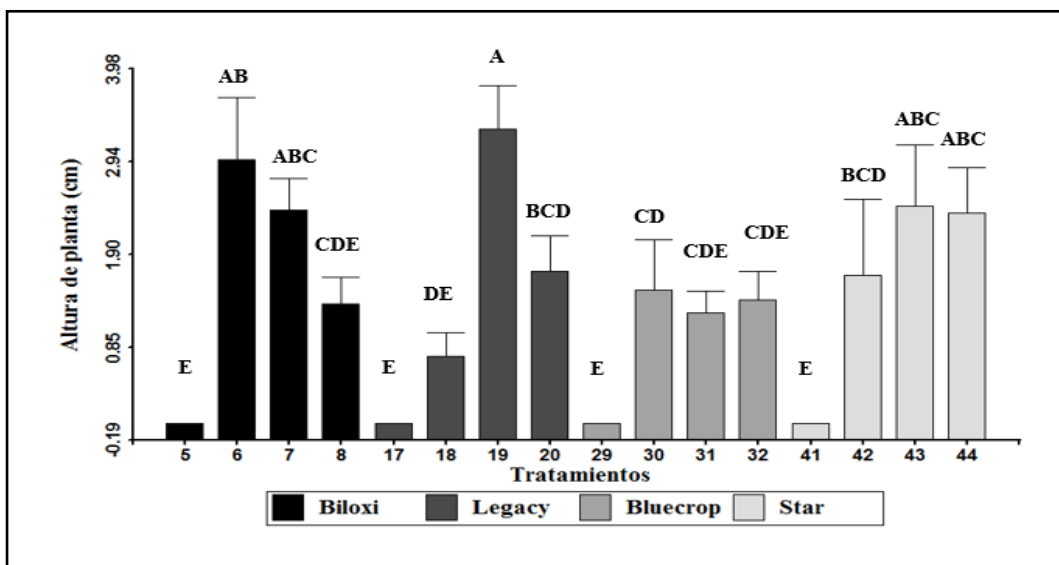
0.0 mg/L las variedades Biloxi, Legacy, Bluecrop y Star mostraron un comportamiento inactivo.



**Figura 14.** Número de hojas en función a cuatro concentraciones de trans-zeatina.

### 5.2.3. Altura (cm)

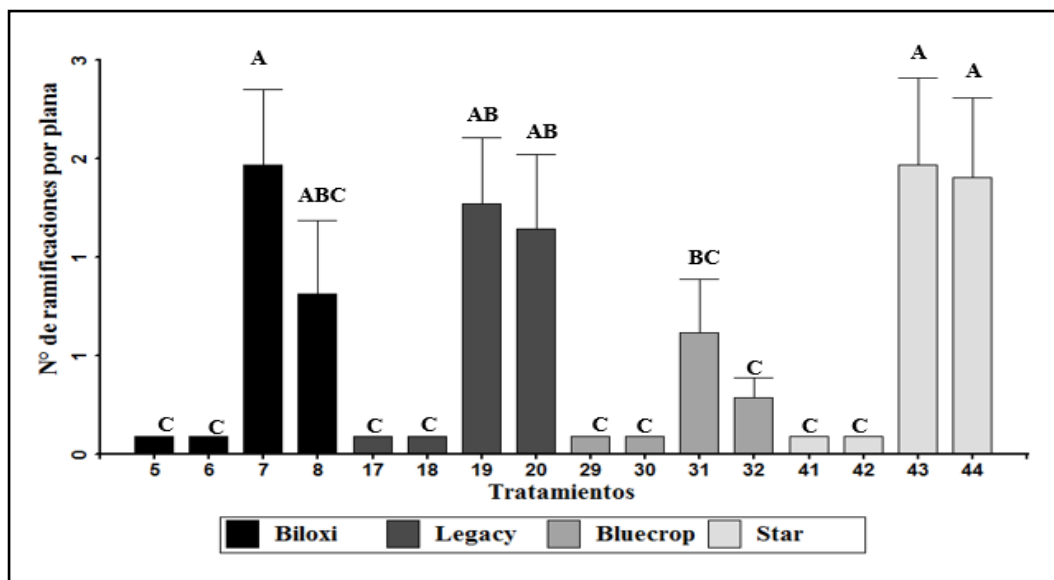
En la figura 15, se muestra la formación de 9 grupos homogéneos correspondiente al promedio altura de planta, donde se observa que los tratamientos T19 y T6 difieren significativamente frente al resto de tratamientos mostrando promedios de 3.31 y 3.0cm. Respectivamente, por otro lado los tratamientos T5, T29 y T43 no mostraron respuesta frente a la aplicación de cuatro concentraciones de trans-zeatina.



**Figura 15.** Altura (cm) en función a cuatro concentraciones de trans-zeatina.

#### 5.2.4. Número de ramificaciones

Los resultados en cuanto al número de ramificaciones, mostraron la formación de 5 grupos homogéneos, donde se observa un primer grupo conformado por los tratamientos T7, T43 y T44, difieren significativamente frente a los demás tratamientos mostrando promedios de 2.1, 2.1 y 2.0 respectivamente, un segundo grupo formado por los tratamientos T19 y T20 con promedios de 2.0 y 1.8, así mismo se observa un tercer y cuarto grupo formado por los tratamientos T8 y T31 presentando promedios de 1.1 y 0.8 respectivamente, finalmente se muestra un grupo más amplio conformado por nueve tratamientos quienes no presentaron respuestas frente a la aplicación de trans-zeatina. Figura 16.

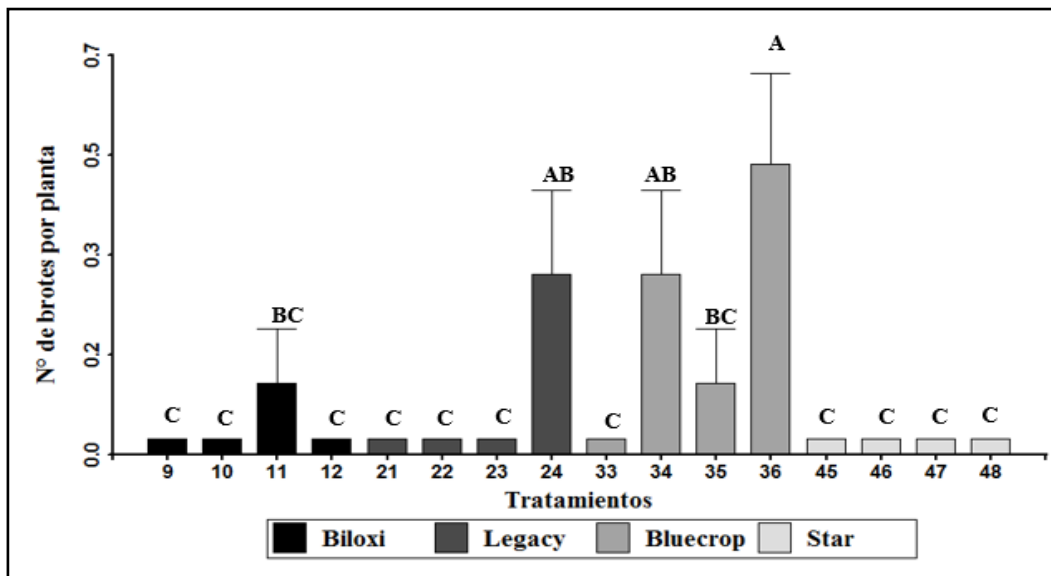


**Figura 16.** Número de Ramificaciones en función a cuatro concentraciones de trans-zeatina.

### 5.3 Determinación de la concentración de cis-zeatina en la multiplicación *in vitro* de segmentos nodales de cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*)

#### 5.3.1. Número de brotes

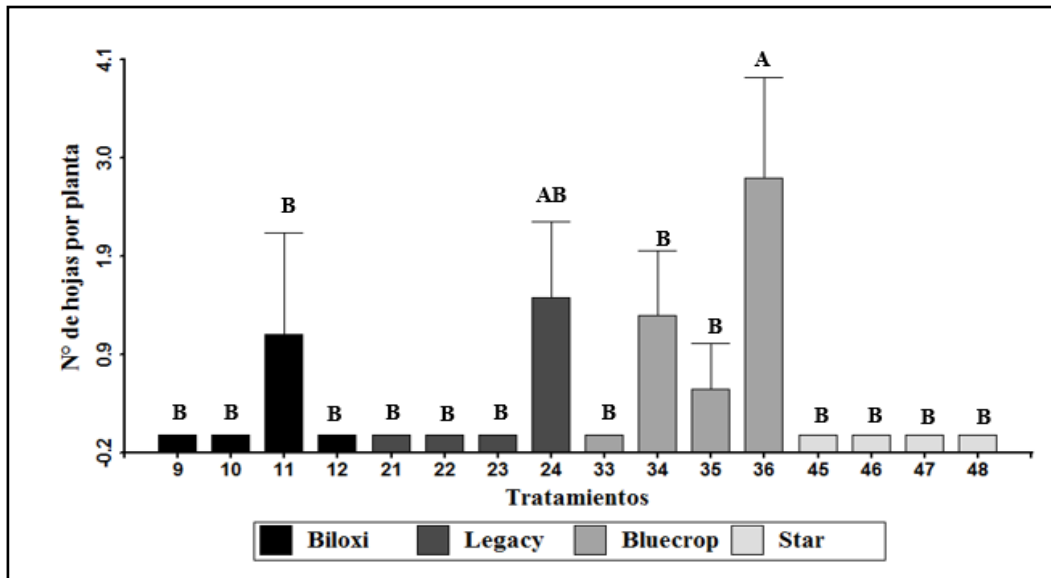
En la figura 17, se muestra la formación de 4 grupos homogéneos correspondiente al promedio número de brotes, donde se observa un primer grupo conformado por el tratamiento T36 con un promedio de 0.5, seguido por los tratamientos T24 y T34 con promedios de 0.3 para ambos casos, un tercer grupo estuvo conformado por los tratamientos T35 y T11 con promedios de 0.1, por último un cuarto grupo conformado por once tratamientos los cuales presentaron un comportamiento inactivo frente a la aplicación de cis-zeatina.



**Figura 17.** Número de brotes en función a cuatro concentraciones de cis-zeatina

#### 5.3.2. Número de hojas

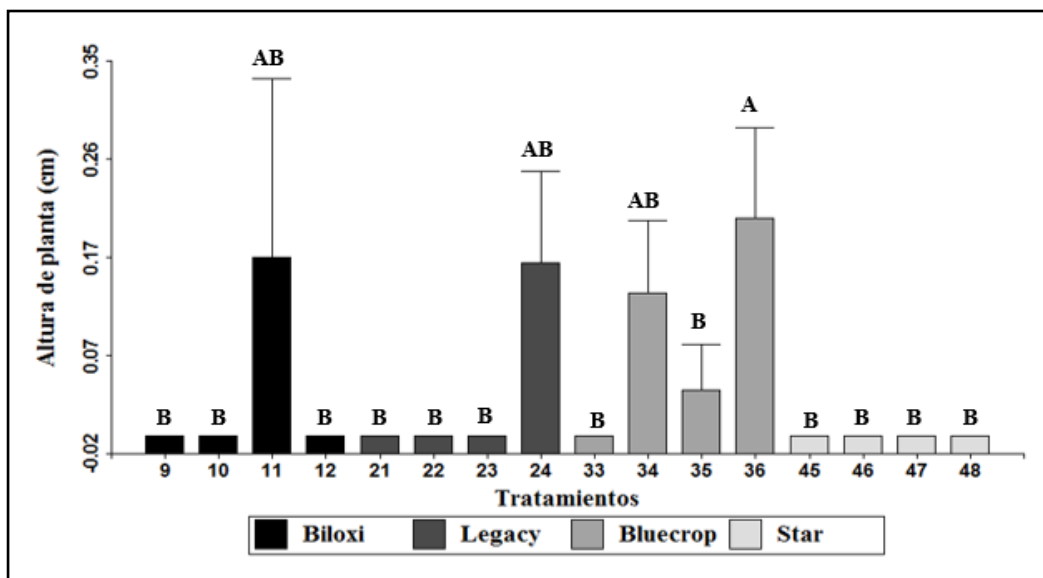
En la figura 18, se muestra la formación de 3 grupos homogéneos correspondiente al promedio número de hojas, donde se observa que el tratamiento T36, difiere significativamente frente a los demás tratamientos mostrando promedios de 2.8, un segundo grupo conformado por el tratamiento T24 presentando un promedio de 1.5, por ultimo un tercer grupo conformado por catorce tratamientos mostrando valores de 1.3 a 0.0 hojas por planta.



**Figura 18.** Número de Hojas en función a cuatro concentraciones de cis-zeatina

### 5.3.3. Altura (cm)

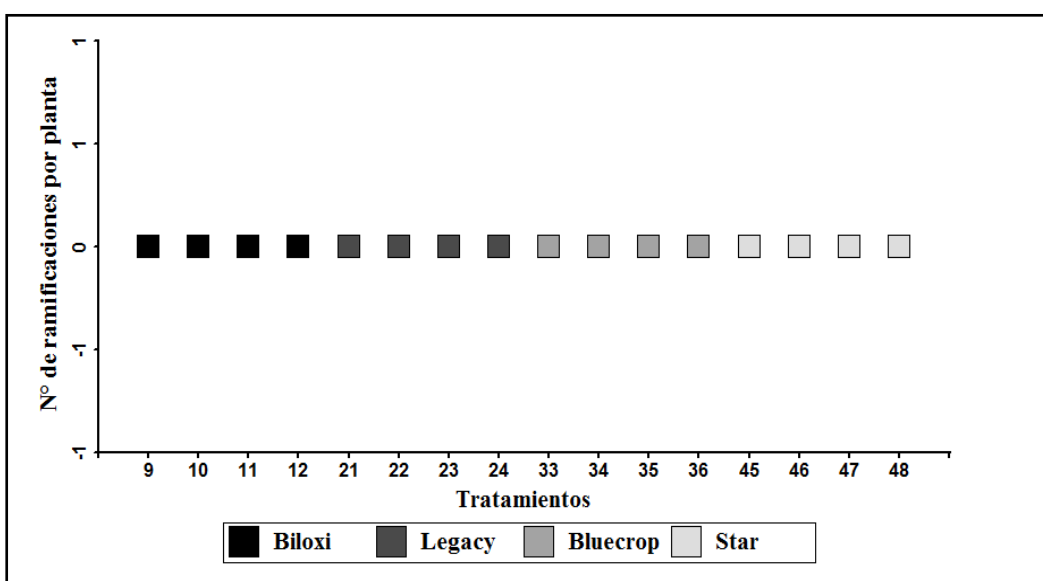
Para la variable altura de planta, se muestra la formación de 3 grupos homogéneos, observándose que el tratamiento T36, difiere significativamente frente a los demás tratamientos mostrando un promedio de 0.25cm por planta, un segundo grupo conformado por los tratamientos T11, T24 y T34 con promedios de 0.17, 0.16 y 0.04 respectivamente por último se observa la formación de un tercer grupo conformado por 12 tratamientos presentando valores de 0.0cm. En síntesis se muestra que la variedad Bluecrop a 0.4mg/L de cis-zeatina presentó un mejor comportamiento con una media de 0.25 cm de altura de planta, seguido por la variedad Biloxi con 0.2mg/L y Legacy con 0.4mg/L presentando promedios de 0.2cm de altura. Así mismo se observa que la variedad Star no presentó respuestas a ninguna de las concentraciones de cis-zeatina, como se muestra en la figura 19.



**Figura 19.** Altura (cm) en función a cuatro concentraciones de cis-zeatina

#### 5.3.4. Número de ramificaciones

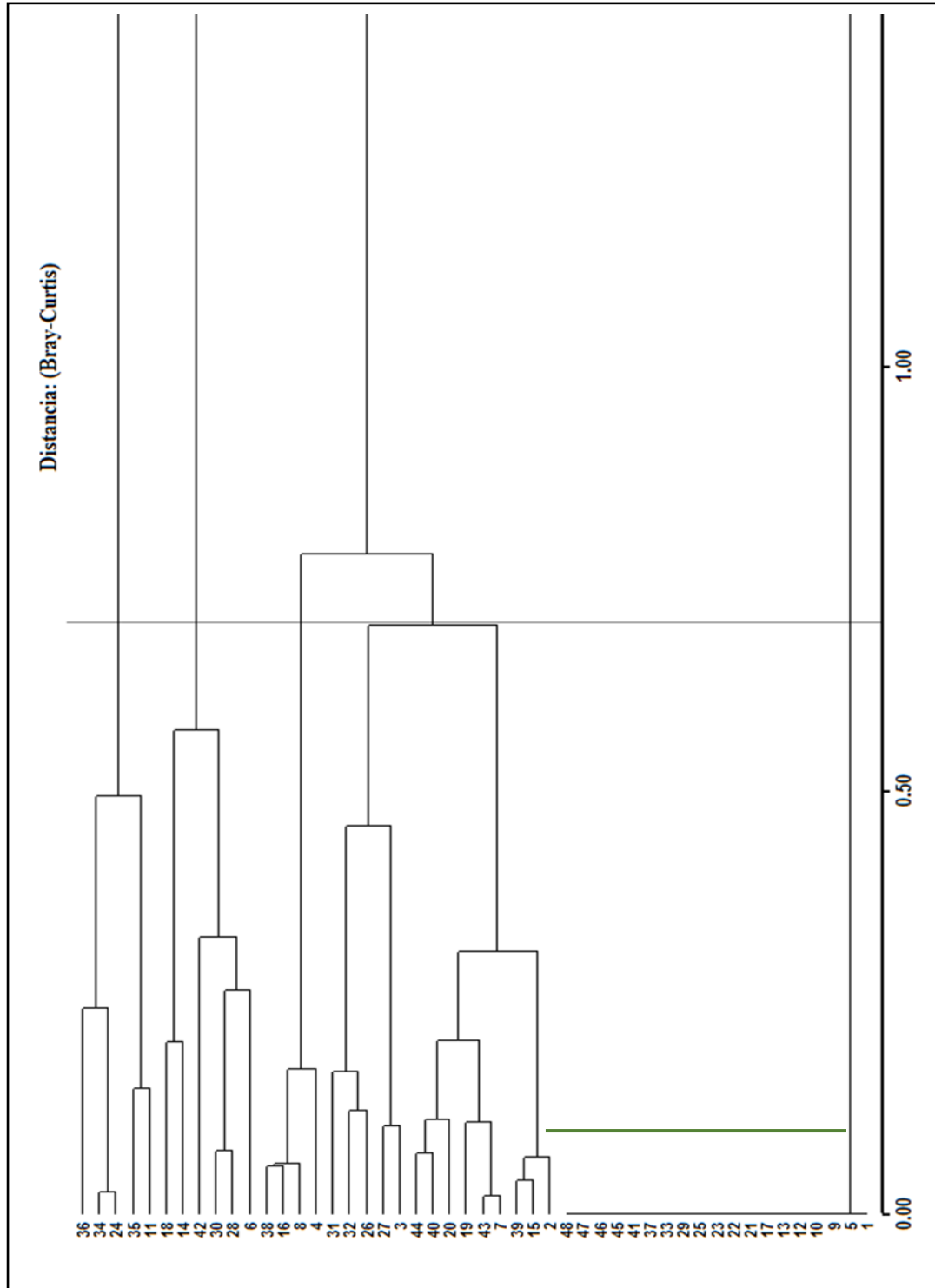
En la figura 20, se muestra el promedio de número de ramificaciones, donde se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos y se puede observar que las concentraciones de (0.0mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L y 4.0mg/L) de cis-zeatina, no mostraron ningún efecto en las variedades de arándano (Biloxi, Legacy, Star y Bluecrop)



**Figura 20.** Número de ramificaciones en función a cuatro concentraciones de cis-zeatina.

#### **5.4. Relación de similitud de los tratamientos durante la multiplicación in vitro.**

En la figura 21, se muestra el índice de Bray Curtis, según el dendograma se formaron 11 grupos homogéneos, donde se muestra que el onceavo grupo está conformado por el mayor número de tratamientos presentando un alto nivel de similitud entre los tratamientos T48, T47, T46, T45, T41, T37, T33, T29, T25, T23, T22, T21, T17, T13, T12, T10, T9, T5 y T1 donde podemos indicar que Cis-zeatina a concentraciones de 0.0mg/L, 1.0mg/L y 2.0mg/L presentan un mismo comportamiento en las variables número de brotes, número de hojas, altura y número de ramificaciones. Por otro lado se muestra que zeatina y trans-zeatina a concentraciones de 0.0mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L y 4.0mg/L presentaron comportamientos diferentes en cada una de las variables como se puede observar en la figura 21, que los tratamientos no comparten el mismo grupo por lo que se puede indicar que existe una diferencia entre cada tratamiento.



**Figura 21.** Relación de similitud con relación a variedades, tipo de citoquininas y concentración de citoquinina

## VI. DISCUSIONES

La concentración de zeatina con mayor efecto sobre la formación de brotes, hojas, altura y número de ramificaciones, se produjo a una concentración de 2.0 mg/L., lo que sugiere ser diferente al resto de los tratamientos, presentando además mejor respuesta en las variedades Biloxi y Bluecrop, estos resultados podrían coincidir con el estudio realizado por Ostrolucká1 *et al.* (2014), en cultivares de *Vaccinium vitis* y *Vaccinium corymbosum*, donde observaron que el medio de cultivo suplementado con 2.0 mg/L., de zeatina presentó una mayor eficiencia en cuanto a número de brotes y número de hojas en las variedades Duke, Bluecrop, Berkeley y Red Pearl.

Así mismo en ensayos realizados por Torres *et al.* (2015), en cultivo *in-vitro* de frambuesa (*Rubus ideaus*) observaron que el medio de cultivo Woody Plant Medium en combinaciones de 2.0mg/L de zeatina presentaron un efecto marcado con influencia en el número de brotes mientras que cuando este medio fue suplementado con Benciladenina no hubo un aumento significativo en cuanto a número de brotes.

Al evaluar el efecto de las concentraciones de zeatina sobre el número de brotes se observó que a concentraciones de 4.0mg/L la producción de los brotes fue mínima y observándose la formación de callos especialmente en las variedades Biloxi y Bluecrop, lo que corrobora con el estudio realizado por George *et al.* (2008), donde concluyeron que el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento favorece la formación de callos y un mínimo número de brotes. Sin embargo estos resultados difieren con lo concluido por Baskaran y Jayabalan (2005), quienes observaron un aumento del número de brotes con el incremento de las concentraciones de zeatina, lo cual no concuerdan con los resultados alcanzados en este trabajo.

Respecto a la variable altura, la concentración de 2.0mg/L presentó un mayor efecto en cuanto al crecimiento de las plantas determinándose que las variedades Biloxi y Bluecrop fueron los más sobresalientes con 3.6cm y 4.1cm respectivamente, resultados similares encontró George *et al.* (2008), donde determinaron que a concentraciones de 1.5mg/L de zeatina resulta suficiente para mantener el crecimiento activo de las plantas *in vitro*.

Así mismo se observó que el efecto de las concentraciones con respecto al crecimiento de las plantas varía según las variedades observándose en la variedad



Biloxi que a concentraciones de 1.0mg/L tiene una respuesta similar a 2.0mg/L con un promedio de 3.5cm., mientras que en las variedades Legacy y Star el efecto es bajo presentando un promedio de 0.6 y 1.9 respectivamente, estos resultados guardan similitud con lo representado por Crots (2014), quien evaluó el efecto de 2 concentraciones de zeatina (1.0 y 1.5 mg/L) y obtuvieron que zeatina a 0.5mg/L mostró un mayor efecto en dos variedades y 1,0mg/L en tres variedades, concluyendo que la altura de los brotes varía según el cultivar y las condiciones del medio.

Según una investigación realizada por Medina y Gonzales (2014), Demostraron que la zeatina a concentraciones de 2.0mg/L promueven un mayor número de ramificaciones y en un menor tiempo, del mismo modo en la proliferación de estas ramificaciones se obtuvieron resultados similares observándose que a concentraciones de 2.0mg/L las variedades de arándano presentaron una mayor respuesta con respecto a los demás, siendo las variedades más resaltantes Star y Bluecrop con un promedio de 1.6 y 1.7 respectivamente. Estos resultados difiere con los obtenidos por Scheidemann *et al.* (2012), quienes reportaron que a concentraciones de 0.5mg/L de zeatina y BAP la proliferación de los brotes adventicios es mayor con respecto a concentraciones de 1.0 mg/L y 2.0mg/L.

Con respecto a trans-zeatina se obtuvieron resultados que evidencian diferencias significativas para las variables número de brotes, hojas, ramificaciones y altura de planta, donde se observó que a concentraciones de 2.0mg/L trans-zeatina tuvo una mayor actividad sobre número de brotes y hojas, especialmente en las variedades Bluecrop y Legacy con promedios de 3.60 y 30.1 respectivamente, al respecto Murillo (2009), manifiesta que trans-zeatina en cultivares de *Eucaliptus glóbulos* a concentraciones de 3.0mg/L tiene una mayor actividad en cuanto a multiplicación de brotes y yemas axilares: del mismo modo Zambrano *et al.* (2017), en la investigación realizada en propagación *in vitro* de *Agave americana* manifestaron que la trans-zeatina a concentraciones de 1.5mg/L suplementado con Benciladenina presentaron un porcentaje máximo de brotes en comparación a los demás tratamientos.

En cambio para la altura y número de ramificaciones se obtuvo que trans-zeatina tiene un mayor efecto a concentraciones de 1.0mg/L. presentando mayor efecto en las variedades Bluecrop, Biloxi y Star. Estos resultados coinciden con la investigación realizada por Torres, Trujillo y Arahana (2010), quienes trabajaron en el cultivo *in vitro* del mortiño (*Vaccinium floribundum Kunth*) demostrando que el

medio Woody Plant Medium suplementado con trans-zeatina a 1.0 mg/L fue el más adecuado para el cultivo de plántulas de mortiño, especialmente si se desea promover abundantes ramificaciones.

Se observó que cis-zeatina presentó un comportamiento inactivo en concentraciones de 1.0 y 2.0mg/L lo que demuestran Gajdošová et al. (2011), que la actividad de las citoquininas de tipo cis-zeatina son extremadamente bajas, así mismo Leonard *et al.* (1971), en una investigación en *Phaseolus* revelaron que cis-zetina tiene poca o ninguna actividad en comparación con zeatina y trans-zeatina, que generalmente se considera la citoquinina natural más inactiva, mostrando en los bioensayos que trans-zeatina tiene 50 veces más actividad que cis-zeatina.

Staden y Drewes (1991), indican que la preparaciones sintéticas de zeatina consisten en isómeros mixtos de cis y trans, pero la forma cis tiene una actividad de citoquinina mucho más baja en comparación a la forma trans. Lo que concuerda con los resultados obtenidos durante la investigación donde se observó la ausencia de respuestas significativas de las variedades en cuanto a número de brotes, hojas, ramificaciones y altura de planta con respecto a las diferentes concentraciones de cis-zeatina.

Lulsdorf *et al.* (2013), afirman que las concentraciones de cis-zeatina son altas durante el desarrollo de cultivares específicos de garbanzo, así mismo demostraron que las plántulas de Musa micro propagadas necesitaban altos niveles de cis-zeatina para poder desarrollarse. Lo que podría asemejarse al presente estudio donde se observó que cis-zeatina comenzó a tener actividad en concentraciones de 4.0mg/L, especialmente en las variedades Legacy y Bluecrop.

Schäfer et al. (2014), indica que la relación que existen entre cultivares y hormonas de crecimiento son múltiples, así mismo indica que las citoquininas actúan dependiendo de las variedades del cultivo y las condiciones en las que se están desarrollando puesto que las fitohormonas son sustancias que coordinan las funciones vitales de las plantas, lo que corrobora con los resultados obtenidos donde se relacionó las variedades de arándano con las citoquininas y se determinó que la zeatina y trans-zeatina tienen un similar comportamiento en cuanto a las variables Altura y número de hojas en las cuatro variedades de arándano, mientras que cis-zeatina no presenta relación entre zeatina y trans-zeatina.

## VII. CONCLUSIONES

1. Zeatina a una concentración de 2.0 mg/L, fue la que tuvo un mejor comportamiento durante la multiplicación in vitro de segmentos nodales en las cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*), presentando mayor número de brotes en las variedades Biloxi y Bluecrop con promedios de 3.6 y 3.5 respectivamente y mayor promedio en cuanto a altura y número de hojas en las variedades Biloxi, Legacy y Bluecrop.
2. La concentración de Trans-zeatina a 2.0mg/L, mostró un mejor comportamiento durante la multiplicación in vitro en cuando a número de brotes, número de hojas y altura de planta en las cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*) y presentando mayor número de ramificaciones en las variedades Biloxi y Legacy con promedios de 2.10 ramificaciones por planta.
3. Por otro lado Cis-zeatina a una concentración de 4.0mg/L fue la que presentó un mejor efecto durante la multiplicación in vitro de las cuatro variedades de arándano (*Vaccinium corymbosum*), mostrando efectos en las variables número de brotes, hojas y altura en las variedades Bluecrop, Legacy y Biloxi.
4. Según el Índice de Bray Curtis se determinó que Cis-zeatina a concentraciones de 0.0mg/L, 1.0mg/L y 2.0mg/L presentaron un alto nivel de similitud en las variables número de brotes, número de hojas, altura y número de ramificaciones. Por otro lado se mostró que zeatina y trans-zeatina a concentraciones de 0.0mg/L, 1.0mg/L, 2.0mg/L y 4.0mg/L presentaron comportamientos diferentes en cada una de las variables.

## VIII. RECOMENDACIONES

1. Estandarizar los factores que influyen en los resultados durante la multiplicación *in vitro* de arándano tales como; horas luz, temperatura del ambiente, Ph del medio de cultivo, entre otros, con el fin de mejorar el porcentaje de brotación.
2. Evaluar la eficiencia de zeatina y Trans-zeatina a concentraciones de 2.0mg/L en otras variedades comerciales de arándanos.
3. Para la fase de establecimiento *in vitro* se recomienda realizar investigaciones en cuanto a la eficiencia del medio de cultivo líquido vs medio cultivo sólido.
4. Replicar la investigación para otros cultivos como las fresas, frambuesas y berries nativos, ya que estos se vienen manejando bajo condiciones de cultivo *in vitro* en el laboratorio de Fisiología y Biotecnología Vegetal de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas.
5. A partir de los resultados obtenidos se recomienda seguir con este trabajo de investigación en el proceso de enraizamiento, aclimatación en invernadero y posterior instalación en campo definitivo.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIANER (2013). Propagación del cultivo de arándanos. Recuperado el 11 de agosto de 2018 de: [https://www.aianer.com.ar/noticias/1374\\_como-realizar-la-propagacion-del-cultivo-arandanos.html](https://www.aianer.com.ar/noticias/1374_como-realizar-la-propagacion-del-cultivo-arandanos.html)
- Altman, A. y Loberant, B. (1998), Micropropagation: clonal Plant propagation *in vitro*. Agricultural Biotechnology. Arie Altman Ed. Chapter, 2(1), 19 – 40.
- Bañados, M.P. (2009). Expanding blueberry production into non-traditional production areas: northern Chile and Argentina, Mexico and Spain.
- Bañados, M.P. (2007). Poda en verde en arándanos. Revista Agronómica Forestal, 31(1), 16-19.
- Berrior, A. y Berthouly, M. (1997). Tecnología del cultivo de tejidos de café: medios y métodos de cultivos *in vitro*. s.n.t. 2, 37-43.
- Bhojwani, S. y Dantu, P. (2013). Plant Tissue Culture: An Introductory Text. India, 35(1), 23-31.
- Bonilla, V. y Esquivel, A. (2016). Establecimiento *in vitro* de (*Vaccinium consanguineum*), un arándano nativo de Costa Rica. Tecnología en marcha, 29 (2), 77-84.
- Brenes, A., Castillo, R. y Gómez, L. (2015). Micropropagación de cuatro cultivares de arándano (*Vaccinium* spp.) a partir de segmentos foliares de dos procedencias. Agronomía Costarricense, 39(1), 7-23.
- Bryla, D. y Strik, B. (2007). Effects of cultivar and plant spacing on the seasonal water requirements of highbush blueberry. Journal of the American Society for Horticultural Science, 132(2), 270-277.
- Buzeta, A. (1997). Chile: Berries para el 2000. Santiago, Fundación Chile.
- Collin, H. y Edwards, S. (1998). Plant Cell Culture. United Kingdom: Springer, 2, 54-59.
- Cronquist, A. (1981). An Integrated system of clasification of flowering plants. US, University Press. 1, 262-268.

- Crots, D. (2014). Propagation of blueberry plants. *Canada*. 34(1), 34-41
- Darnell, R.L. (1991). Photoperiod, carbon partitioning, and reproductive development in rabbiteye blueberry. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116: 856-860.
- Emery, R., Leport, L., Barton, E., Turner, N. y Atkins, C. (1998). *Cis-Isomers* of cytokinins predominate *Cicer arietinum* throughout their development. *Plant Physiol*, 117(1), 1515-1523.
- Endress, R. (1994). *Plant cell biotechnology*. Springer publishing company. Germany. Recuperado el 28 de agosto de 2018 de: <https://www.abebooks.com/book-search/title/plant-cell-biotechnology/author/endress.pdf>
- Erig, A.C. y Schuch, M.W. (2006). Factores que afectan la Multiplicación *in vitro* de Mirtilo. *Scientia Agraria*, 7(1-2), 83-88.
- Gajdošová, S., Spíchal, L., Kamínek, M. y Hoyerová, K. (2011). Distribution, biological activities, metabolism, and the conceivable function of *cis*-zeatin-type cytokinins in plants. *J Exp Bot*, 62, 2827–2840.
- García, J. (2015). Orientación para el cultivo de arándano. Gobierno de España. Recuperado el 11 de agosto de 2018 de: [http://www.naviaporcia.com/images/documentos/documento\\_173.pdf](http://www.naviaporcia.com/images/documentos/documento_173.pdf)
- Garrido, V. (2014). Arándano rojo (*Vaccinium macrocarpon*). *Reduca (Biología)*. Serie Botánica, 7 (2), 100-112.
- George, F., Hall, M. y Kler, G. (2008). Plant propagation by Tissue Culture. *The Background*, 3(1), 112-1119.
- Gonzales, A. y Morales, C. (2017). Variedades de arándano. *Boletín INÍA-INDAP Santiago*, 6(1), 11-19.
- González, M., Valdés, A. y Ordas, R. (2000). Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Annals of Applied Biology*, 137(1), 73-78.
- Gordó, M. (2008). Guía práctica para el cultivo de arándano en la provincia de buenos aires. INTA. Recuperado el 28 de julio de 2018 de: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-mg\\_0801.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-mg_0801.pdf)

- Gough, R.E. (1994). The highbush blueberry and its management. The Haworth Press, Inc. Binghamton, NY. Pp.229. Recuperado el 28 de Julio de 2018 de: <https://www.jlindsayoneill.com/DOC-ID/the-highbush-blueberry-and-its-management.pdf>.
- Gresshoff, P. y Doy, C. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, *17*, 161–170.
- Jin, S., Jun, D., Tae, K. y Jae, H. (2011) Growth and photosynthetic characteristics of blueberry (*Vaccinium corymbosum* cv. Bluecrop) under various shade levels, *Scientia Horticulturae*, *129*, 486-492.
- Jordan, M. y Casaretto, J. (2006). Hormonas y reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas. Fisiología vegetal. Chile.
- Leonard, N., Playtis, A; Skoog, F. y Schmitz, R. (1971). Stereoselective synthesis of *cis*-zeatin. *Journal of the American Chemical Society*, *93*, 3056–3058.
- Lloyd, G. y McCown, B. (1981). Commercially feasible micropropagation of Mountain Laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Combined Proceedings-Internaticlonal Plant Propagator's Society*, *30*, 421-427.
- Lulsdorf, M., Yuan, Y., Slater, H., Vandenberg, A. y Han, M. (2013). Endogenous hormone profiles during early seed development of *C. arietinum* and *C. anatolicum*. *Plant Growth Regulation*, *71*, 191–198.
- Medina, R. y Gonzales, J. (2014). Organogénesis directa a partir de láminas foliares. Honduras.
- Meiners, J., Schwab M. y Szankowski, I. (2007). Efficient *in vitro* regeneration systems for *Vaccinium* species. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, *89* (2), 169-176.
- MINAGRI. (2016). El arándano en el Perú y el mundo: producción, comercio y perspectivas, Dirección General de Políticas Agrarias. Recuperado el 28 de julio de 2018 de: [http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/f-taxonomia\\_plantas/f01-cultivo/el\\_arandano.pdf](http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/tematicas/f-taxonomia_plantas/f01-cultivo/el_arandano.pdf)
- Moore, J.N. (1994). Cultivars, breeding, and culture of blueberries in North America. *Acta Hort. (ISHS)*.*23*, 11-16.

- Murillo, C. (2009). *In vitro* cultivation of eucalyptus. *Situe*.1,15-23
- Olmos, S., Luciani, G. y Galdeano, E. (2004). Micropropagación. En: *Biología y Mejoramiento Vegetal*. (Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. eds.). Ediciones INTA, 46, 163-172.
- Ostrolucká1, M., Libiaková, G., Ondrušková, E. y Gajdošová1, A. (2014). *In vitro* propagation of *Vaccinium* species. *Acta Universitatis Latviensis, Biology*, 676(1), 207–212.
- Pérez, J.N. (1998). *Propagación y Mejora genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Villa Clara. Cuba.
- Pérez, E., Ramírez, R., Núñez, H. y Ochoa, N. (1999). *Introducción al cultivo de tejidos vegetales*. Mexico: Universidad Autónoma de Aguas Calientes. Recuperado de: <http://bdigital.dgse.uaa.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/1194/416122.pdf.1&isAllowed.pdf>.
- Pospíšilová, J., Tichá, T., Kadleček, P., Haisel, D. y Plzáková, S. (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia plantarum*, 42 (4), 481-497.
- Roca, W. y Mroginski, L. (1991). Cultivo de Tejidos. *Agricultura*. 12, 34-39
- Roca, W.M. y Mroginski, L. (1992). *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali. Colombia.
- Rodríguez, B., Marcelo, M. y Morales, U. (2015). Efecto de la densidad de explantes y el volumen de medio de cultivo sobre la multiplicación *in vitro* de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) variedades Brigitta y Legacy. *Scientia Agropecuaria*, 6(1), 31-40.
- Romero, C. (2016). El arándano en el Perú y el mundo. Minagri. Recuperado el 27 de julio de 2018 de: <http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/> pdf.
- Rosell, C.H. y Villalobos, V. (1990). *Fundamento teórico-práctico del cultivo de tejidos vegetales*. Roma, FAO, 64, 143.



- Schäfer, M., Meza, I., Navarro, A., Brutting, C. y Meldau, S. (2014). Cytokinin levels and signaling respond to wounding and the perception of herbivore elicitors in *Nicotiana attenuata*. *J Integr Plant Biol*.
- Scheidemann, A. y Scheider, S. (2012). Study of zeatin and benzyl aminopurine in tissue cultures of woody plants, 1, 28-36.
- Sharry, S., Adema, M. y Abedini, W. (2015). Manual para la propagación de plantas por cultivo de tejidos *in vitro*. Recuperado el 08 de agosto de 2017, de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento\\_completo.pdf](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/46738/Documento_completo.pdf).
- Singh, M., Arseneault, M., Sanderson, T., Murthy, V. y Ramassamy, C. (2008). Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4855-4873.
- Staden, J. y Drewes, F. (1991). The biological activity of cytokinin derivatives in the soybean callus bioassay. *Plant Growth Regul*, 10(1), 109-115.
- Trauco, V.M. (2016). "Efecto de cuatro concentraciones de citoquininas en la multiplicación *in vitro*" de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.). cv. Biloxy. Recuperado de <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9944>
- Torres, E., Medina, J. y Granados, C. (2015). Adventitious shoot elongation of raspberry (*Rubus idaeus* L.) is influenced by brassinosteroids. *Revista Mexicana de ciencias agrícolas*, 6(5), 991-999.
- Torres, M., Trujillo, D. y Arahana, V. (2010). Cultivo *in vitro* de Mortiño (*Vaccinium floribundum*). *AVANCES*, 2(1), 9-15.
- Trehane, J. (2004). *Blueberries, Cranberries and other Vacciniums*. Timber Press, Portland y Cambridge. Recuperado de [http://www.timberpress.com/books/blueberries\\_cranberries\\_other\\_vacciniums/trehane/9781604690729](http://www.timberpress.com/books/blueberries_cranberries_other_vacciniums/trehane/9781604690729)
- Velásquez & Daga (2016). Amazonas es una región con gran potencial para el cultivo de berries. Acceso el 12 de agosto de 2017. Recuperado de

<https://www.sierraexportadora.gob.pe/2016/07/03/amazonas-es-una-region-con-gran-potencial-para-el-cultivo-de-los-berries>

Villalobos, V. y García, V. (1982). Obtención de plantas de clavel (*Dianthus caryophyllus* L) libres de virus por cultivo *in vitro* de meristemas y ápices vegetativos. *Agrociencia*, 48 (3), 107-118

Zambrano, S. y Guzmán, C. (2017). In vitro propagation of *agave americana* by indirect organogenesis. *Hort Science*, 52(7), 1-5

## X. ANEXOS

### 10.1. ANEXO 1: Tablas

**Tabla 3.** Prueba de Kruskal-Wallis para las variables número de brotes, número de hojas, altura y número de ramificaciones bajo cuatro concentraciones de zeatina

Variable	Kruskal – Wallis		Med ia	Medi ana	T	Tratamientos		
	H	P				Ci	Va	Co
N° Brotes	98.37**	<0.0001	3.60	3.50	3	1	1	3
			3.50	3.50	27	1	3	3
N° Hojas	80.65**	<0.0001	27.7	27.5	3	1	1	3
Altura (cm)	88.23**	<0.0001	4.1	4.27	27	1	3	3
N° de Ramificaciones	-	-	-	-	-	-	-	-

\*\*Altamente significativo T: Tratamiento. Ci: Citoquinina. Va: Variedad. Co: Concentración

**Tabla 4.** Prueba de Kruskal-Wallis para las variables número de brotes, número de hojas, altura y número de ramificaciones bajo cuatro concentraciones de Trans-zeatina

Variable	Kruskal – Wallis		Medi a	Medi ana	T	Tratamientos		
	H	P				Ci	Va	Co
N° Brotes	92.27**	<0.0001	3.60	3.50	31	2	3	3
N° Hojas	74.64**	<0.0001	30.10	32.50	19	2	2	3
Altura (cm)	64.68**	<0.0001	3.31	3.47	19	2	3	3
			2.96	3.47	6	2	1	2
N° de Ramificaciones	40.31**	<0.0001	2.10	2.00	7	2	1	3
			2.10	2.00	43	2	4	3
			2.00	2.00	44	2	4	4

\*\*Altamente significativo T: Tratamiento. Ci: Citoquinina. Va: Variedad. Co: Concentración

**Tabla 5.** Prueba de Kruskal-Wallis para las variables número de brotes, número de hojas, altura y número de ramificaciones bajo cuatro concentraciones de Cis-zeatina

Variable	Kruskal – Wallis		Med ia	Media na	T	Tratamientos		
	H	P				Ci	Va	Co
N° Brotes	10.27	0.0001	0.50	0.50	36	3	3	4
N° Hojas	10.17	0.0001	2.80	2.00	36	3	3	4
Altura (cm)	10.23	0.0001	0.25	0.21	36	3	3	4
N° de Ramificaciones	0.00	-	-	-	-	-	-	-

\*\*Altamente significativo T: Tratamiento. Ci: Citoquinina. Va: Variedad. Co: Concentración

**Tabla 6.** Comparación de medias para el variable número de brotes en función a cuatro concentraciones de zeatina

TRATAMIENTOS	MEDIAS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
3	3.60	A
27	3.50	A
26	1.70	B
2	1.60	B
15	1.40	B
16	1.20	BC
39	1.20	BC
40	1.10	BC
28	1.10	BC
38	1.10	BC
4	1.00	BC
14	0.50	CD
1	0.00	D
13	0.00	D
25	0.00	D
37	0.00	D

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 7.** Comparación de medias para el variable número de hojas en función a cuatro concentraciones de zeatina

TRATAMIENTOS	MEDIAS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
3	27.70	A
27	26.70	AB
2	25.10	AB
39	23.90	ABC
15	21.26	ABC
26	19.90	ABCD
40	19.70	ABCD
38	15.40	BCDE
16	13.30	CDE
4	12.50	CDE
28	9.80	DEF
14	4.90	EF
1	0.00	F
13	0.00	F
37	0.00	F
25	0.00	F

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 8.** Comparación de medias para la variable altura de planta en función a cuatro concentraciones de zeatina

TRATAMIENTOS	MEDIAS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
27	4.10	A
3	3.61	AB
2	3.50	AB
39	3.21	AB
15	2.95	AB
40	1.94	BC
38	1.86	BC
26	1.63	C
4	1.60	C
16	1.42	C
28	1.21	CD
14	0.64	CD
25	0.00	D
37	0.00	D
1	0.00	D
13	0.00	D

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 9.** Comparación de medias para el variable número de brotes en función a cuatro concentraciones de zeatina

TRATAMIENTOS	MEDIAS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
31	3.00	A
32	2.50	AB
19	2.00	ABC
20	2.00	ABC
7	2.00	ABC
43	1.70	BCD
44	1.30	CDE
8	1.10	CDEF
30	0.90	CDEF
6	0.70	DEF
18	0.50	EF
42	0.30	EF
17	0.00	F
29	0.00	F
5	0.00	F
41	0.00	F

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 10.** Comparación de medias para el variable número de hojas en función a cuatro concentraciones de Trans-zeatina

TRATAMIENTOS	MEDIAS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
19	30.10	A
43	25.90	AB
7	25.30	AB
31	23.60	AB
44	21.40	AB
20	20.00	ABC
32	18.10	BC
8	16.90	BC
6	10.10	CD
30	9.20	CD
18	5.80	D
42	4.30	D
17	0.00	D
5	0.00	D
29	0.00	D
41	0.00	D

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 11.** Comparación de medias para la variable altura de planta en función a cuatro concentraciones de Trans-zeatina

TRATAMIENTOS	MEDIAS	GRUPOS HOMOGÉNEOS
19	3.31	A
6	3.00	A
43	2.44	AB
7	2.39	ABC
44	2.37	ABC
20	1.71	BCD
42	1.67	BCD
30	1.50	CD
32	1.39	CDE
8	1.34	CDE
31	1.24	CDE
18	0.76	DE
17	0.00	E
5	0.00	E
29	0.00	E
41	0.00	E

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 12.** Comparación de medias para el variable número de ramificaciones en función a cuatro concentraciones de Trans-zeatina

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MEDIAS</b>	<b>GRUPOS HOMOGÉNEOS</b>
7	2.10	A
43	2.10	A
44	2.00	A
19	1.80	AB
20	1.60	AB
8	1.10	ABC
31	0.80	BC
32	0.30	C
6	0.00	C
5	0.00	C
18	0.00	C
41	0.00	C
17	0.00	C
30	0.00	C
29	0.00	C
42	0.00	C

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 13.** Comparación de medias para el variable número de brotes en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MEDIAS</b>	<b>GRUPOS HOMOGÉNEOS</b>
36	0.50	A
24	0.30	AB
34	0.30	AB
35	0.10	BC
11	0.10	BC
33	0.00	C
21	0.00	C
23	0.00	C
48	0.00	C
45	0.00	C
46	0.00	C
47	0.00	C
12	0.00	C
22	0.00	C
10	0.00	C
9	0.00	C

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 14.** Comparación de medias para el variable número de hojas s en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MEDIAS</b>	<b>GRUPOS HOMOGÉNEOS</b>
36	2.80	A
24	1.50	AB
34	1.30	B
11	1.10	B
35	0.50	B
48	0.00	B
9	0.00	B
45	0.00	B
47	0.00	B
22	0.00	B
21	0.00	B
12	0.00	B
10	0.00	B
33	0.00	B
23	0.00	B
46	0.00	B

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

**Tabla 15.** Comparación de medias para la variable altura de planta en función a cuatro concentraciones de Cis-zeatina

<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>MEDIAS</b>	<b>GRUPOS HOMOGÉNEOS</b>
36	0.25	A
11	0.17	AB
24	0.16	AB
34	0.04	AB
35	0.00	B
10	0.00	B
9	0.00	B
23	0.00	B
21	0.00	B
47	0.00	B
22	0.00	B
33	0.00	B
12	0.00	B
46	0.00	B
45	0.00	B
48	0.00	B

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

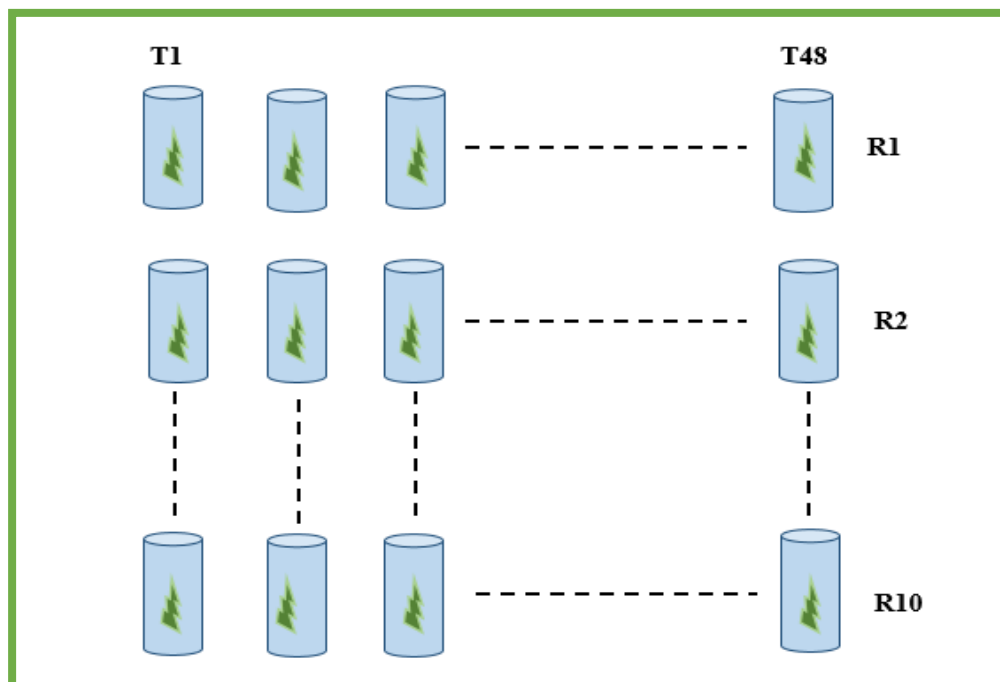


**Tabla 16.** Diseño trifactorial de los tratamientos en un diseño completamente al Azar.

Variedades	Citoquininas	Concentración de citoquininas	Tratamientos
Biloxi	Zeatina	0.0mg/L	T1
		1.0mg/L	T2
		2.0mg/L	T3
		4.0mg/L	T4
	Trans-zeatina	0.0mg/L	T5
		1.0mg/L	T6
		2.0mg/L	T7
		4.0mg/L	T8
	Cis-zeatina	0.0mg/L	T9
		1.0mg/L	T10
		2.0mg/L	T11
		4.0mg/L	T12
Legacy	Zeatina	0.0mg/L	T13
		1.0mg/L	T14
		2.0mg/L	T15
		4.0mg/L	T16
	Trans-zeatina	0.0mg/L	T17
		1.0mg/L	T18
		2.0mg/L	T19
		4.0mg/L	T20
	Cis-zeatina	0.0mg/L	T21
		1.0mg/L	T22
		2.0mg/L	T23
		4.0mg/L	T24
Bluecrop	Zeatina	0.0mg/L	T25
		1.0mg/L	T26
		2.0mg/L	T27
		4.0mg/L	T28
	Trans-zeatina	0.0mg/L	T29
		1.0mg/L	T30
		2.0mg/L	T31
		4.0mg/L	T32
	Cis-zeatina	0.0mg/L	T33
		1.0mg/L	T34
		2.0mg/L	T35
		4.0mg/L	T36
Star	Zeatina	0.0mg/L	T37
		1.0mg/L	T38
		2.0mg/L	T39
		4.0mg/L	T40
	Trans-zeatina	0.0mg/L	T41
		1.0mg/L	T42
		2.0mg/L	T43
		4.0mg/L	T44
	Cis-zeatina	0.0mg/L	T45
		1.0mg/L	T46
		2.0mg/L	T47
		4.0mg/L	T48

## 10.2. ANEXO 3: Panel fotográfico

**Figura 22.** Diseño de la observación visual de cada tratamiento.



**Figura 23.** Fase de establecimiento en medio de cultivo líquido.

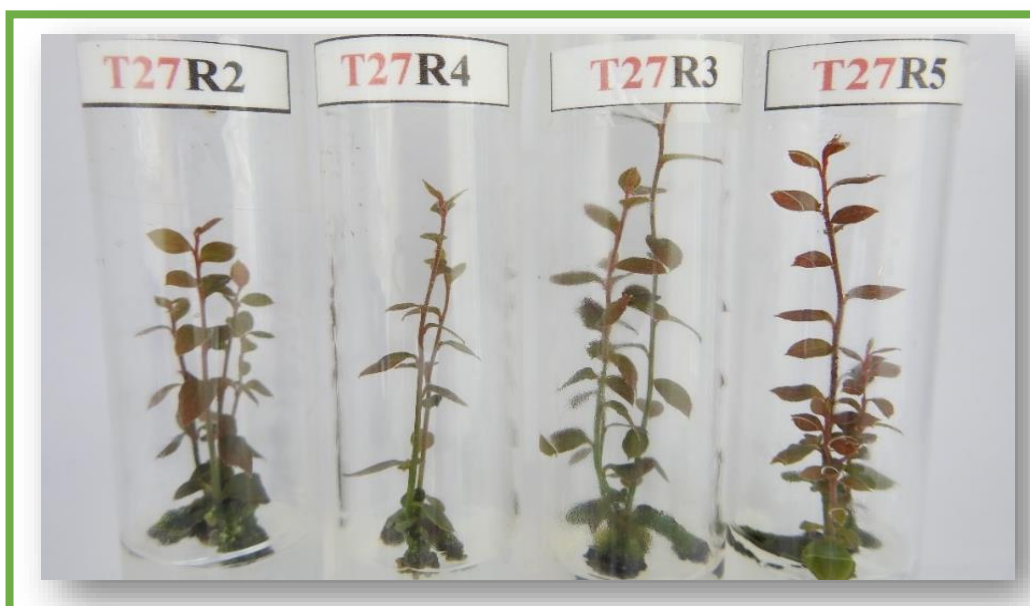


A. Variedad Star B. Variedad Biloxi C. Variedad Legacy D. Variedad Bluecrop

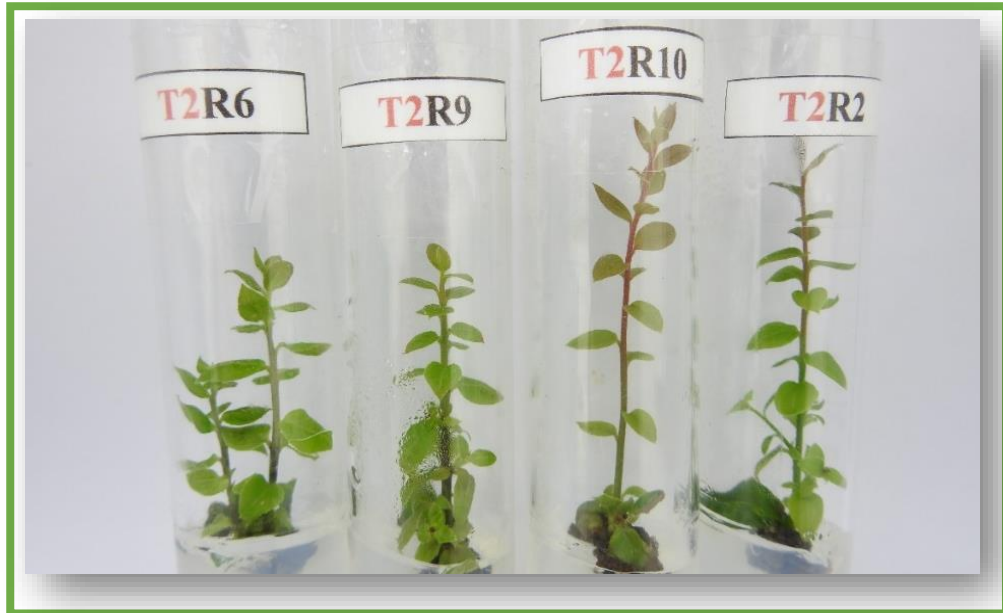
**Figura 24.** Plantines de la variedad Biloxi a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con Zeatina a 2.0mg/L, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 3)



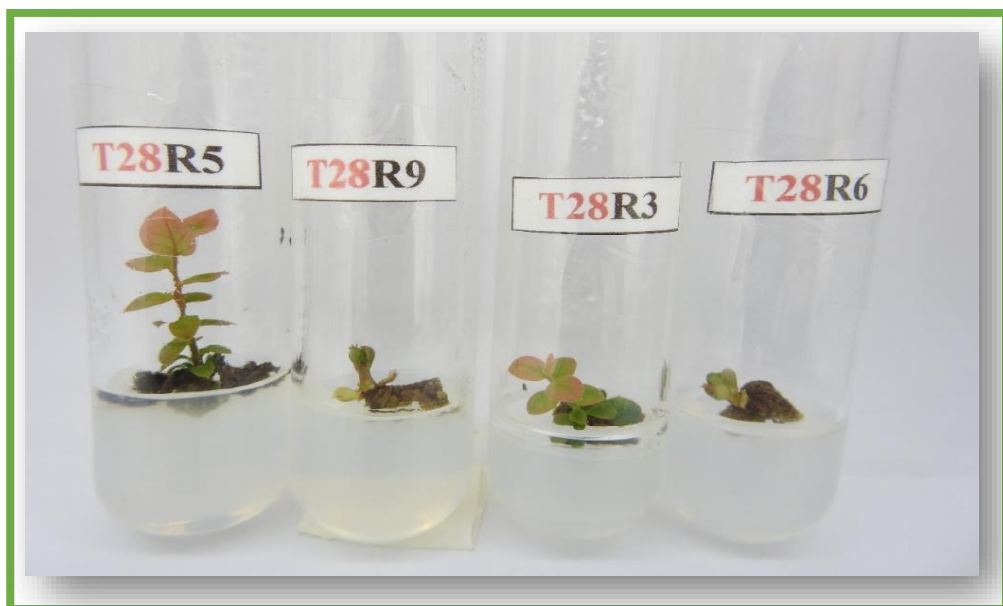
**Figura 25.** Variedad Bluecrop a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 2.0mg/L de Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 27)



**Figura 26.** Variedad Biloxi a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 1.0mg/L de Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 2)



**Figura 27.** Variedad Bluecrop a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 4.0mg/L de Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 28)



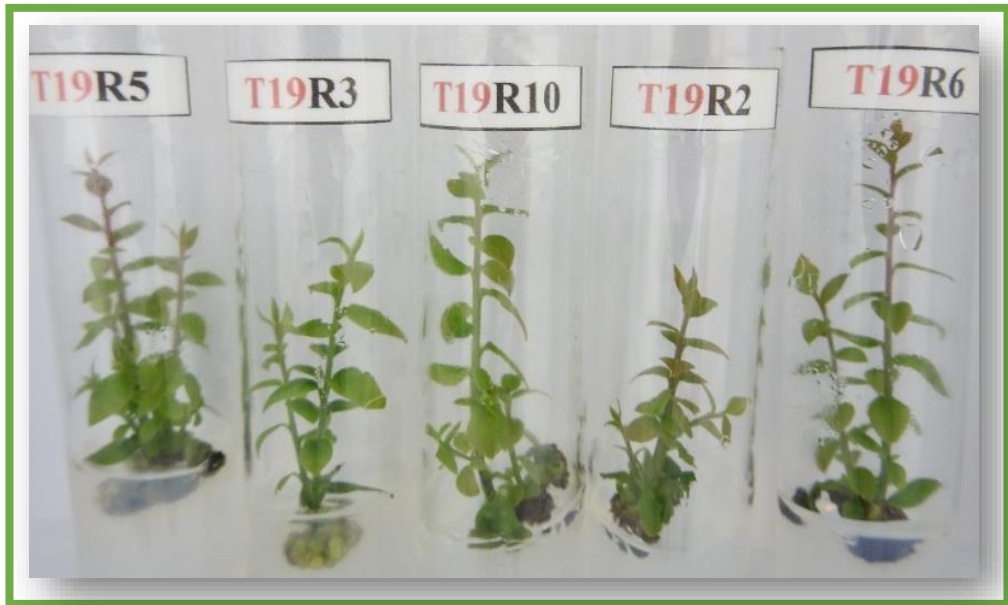
**Figura 28.** Variedad Legacy a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 1.0mg/L de Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 14)



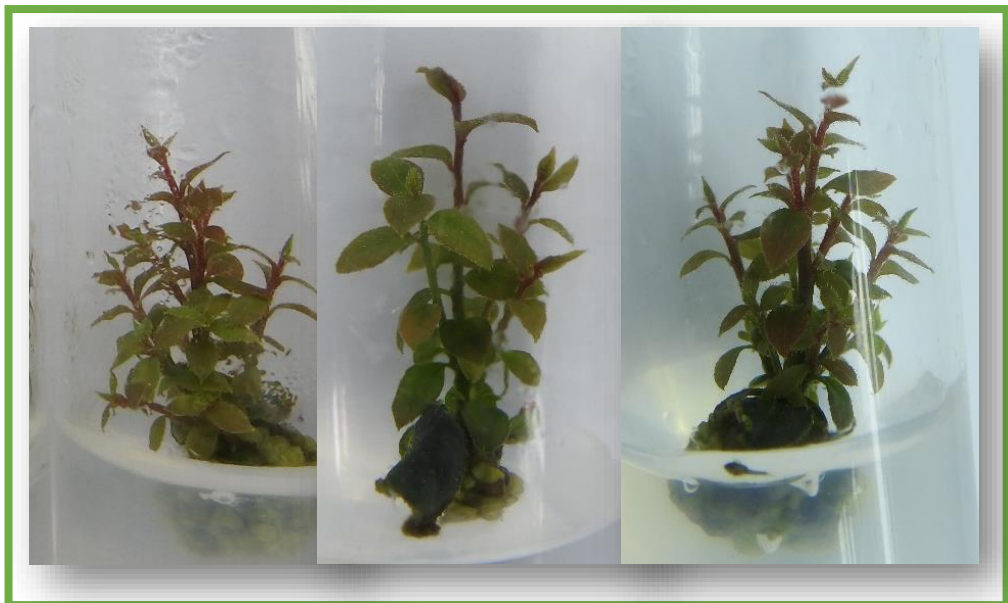
**Figura 29.** Variedad Biloxi a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 4.0mg/L de Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 4)



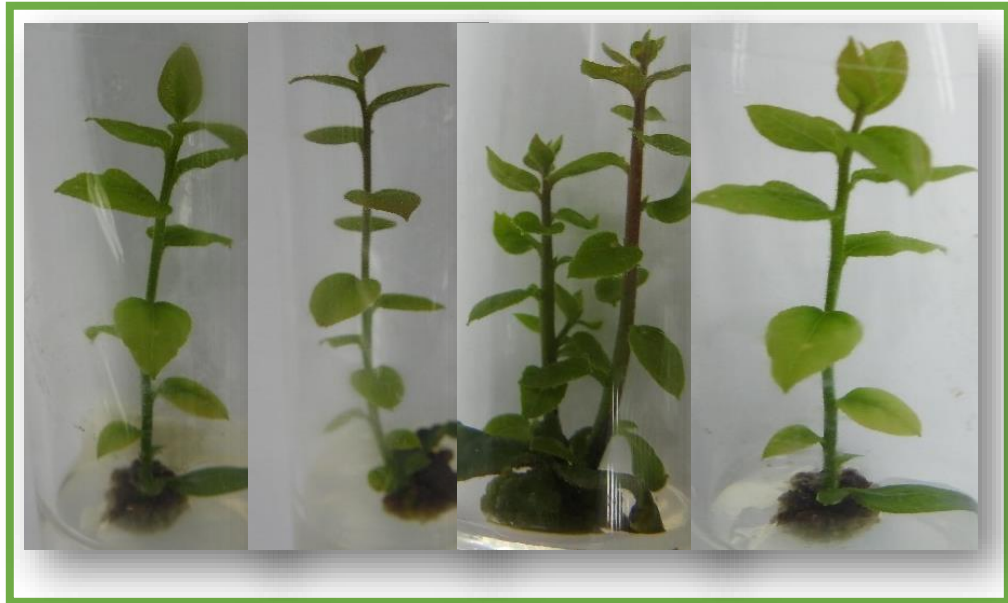
**Figura 30.** Variedad Legacy a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 2.0mg/L de Trans Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 19)



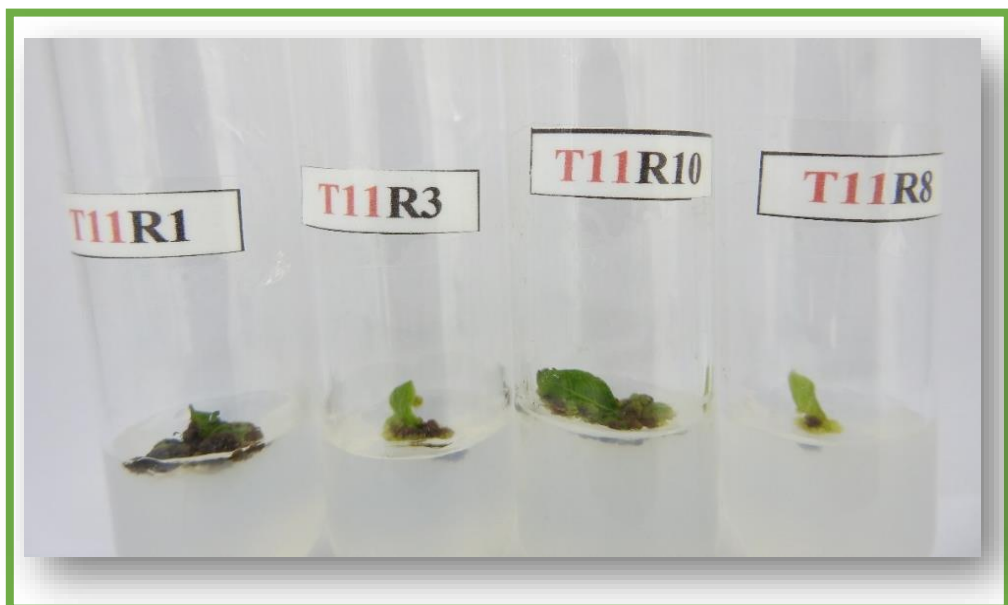
**Figura 31.** Variedad Star a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 2.0mg/L de Trans Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 43)



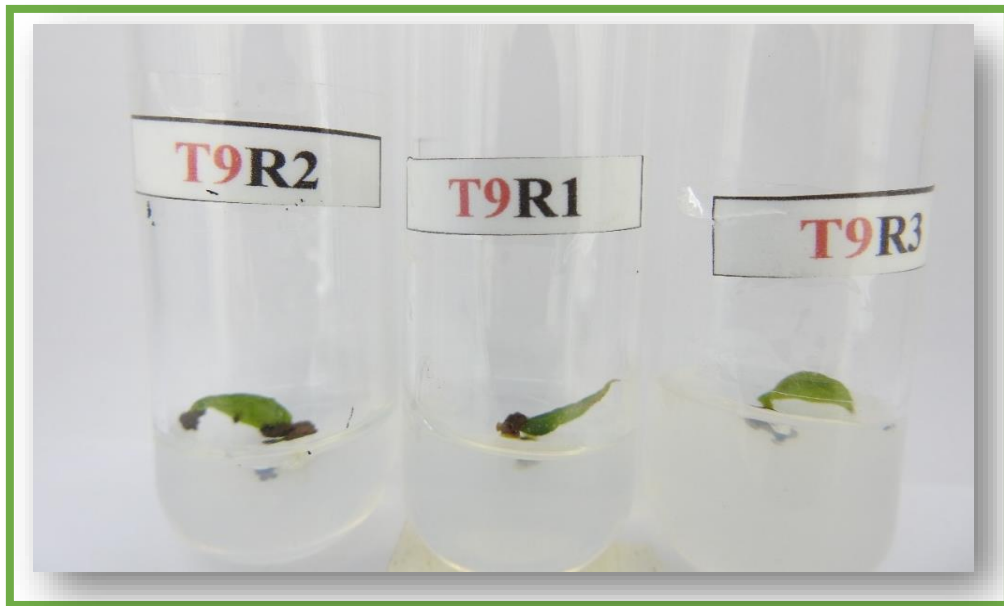
**Figura 32.** Variedad Biloxi a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 1.0mg/L de Trans Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 6)



**Figura 33.** Variedad Biloxi a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 2.0mg/L de Cis Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 11)



**Figura 34.** Variedad Biloxi a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 0.0mg/L de Cis Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 9)



**Figura 35.** Variedad Star a los 50 días de introducción al medio de cultivo Woody Plant Medium suplementado con 1.0mg/L de Cis Zeatina, bajo condiciones de estricta asepsia. (Tratamiento 46)

